Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. E. Bauereisen

DER OXIDATIVE METABOLISMUS DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER BEI PERFUSION MIT VERSCHIEDENEN MEDIEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Bernhard Decke
aus Wallmersbach

Würzburg, den 29. Juni 1981

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. E. Baue reisen

DER OXIDATIVE METABOLISMUS DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER BEI PERFUSION MIT VERSCHIEDENEN MEDIEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Bernhard Decke
aus Wallmersbach

Würzburg, den 29. Juni 1981

Referent: Prof.Dr.med.J.Lutz

Korreferent: Prof.Dr.med.E.Bauereisen

Dekan: Prof.Dr.med.K.H.Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Zur historischen Entwicklung der Leberperfusion	1
1.2.	Perfluorcarbonlösungen als Erythrozytenersatz	2
2.	METHODIK	4
2.1.	Leberperfusion	4
2.1.2.	Operationstechnik	4
2.1.1.1.	Operationsverlauf	4
2.1.2.	Versuchstiere	6
2.1.3.	Perfusionsmedien	7
2.1.4.	Perfusionsapparatur	10
2.1.5.	Durchführung der Experimente	12
2.2.	Analytik	13
2.2.1.	Sauerstoffmessung	13
2.2.1.1.	Messung mit dem Lex O_2 Con - Gerät	13
2.2.1.2.	Messung mit der Platinelektrode	14
2.2.2.	CO_2 und pH Messung	15
2.2.3.	Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen	15
2.2.3.1.	Glucose	16
2.2.3.2.	Harnstoff	16
2.3.1.	Auswertung	17
2.3.2.	Statistische Berechnungen	18
3.	ERGEBNISSE	21
3.1.	Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion der Perfusionsmedien mit und ohne Zugabe von Aminosäuren, Pyruvat, Fettsäuren und Ammoniumchlorid	21
3.1.1.	O_2 Verbrauch ohne Substratgabe	22
3.1.2.	O_2 Extraktion verschiedener Perfusionsmedien	23
3.1.3.	Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Pyruvatgabe	26

3.1.4.	Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Aminosäurengabe	29
3.1.5.	Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Fettsäurengabe	32
3.1.6.	Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Arginin- und Ammoniumchloridgabe	34
3.1.7.	Vergleich der Wirkung von Pyruvat, Aminosäuren, Fettsäuren und Ammoniumchlorid auf den O_2 Verbrauch	35
3.1.8.	O_2-Verbrauch der verschiedenen Perfusionsmedien in Abhängigkeit vom O_2 Angebot	37
3.2.	Glucoseproduktion und Harnstoffproduktion der Perfusionsmedien	44
3.2.1.	Glucoseproduktion der Lebern nach Gabe von Pyruvat, Aminosäuren und Fettsäuren bei den verschiedenen Perfusionsmedien	44
3.2.2.	Steigerung der Glucoseproduktion durch Pyruvatgabe bei den verschiedenen Medien	47
3.2.3.	Harnstoffproduktion der Leber nach Gabe von Aminosäuren, Pyruvat und Fettsäuren bei den verschiedenen Perfusionsmedien	49
3.2.4.	Steigerung der Harnstoffproduktion nach Aminosäurengabe bei verschiedenen Medien	51
3.2.5.	Das Verhältnis von Sauerstoffmehrverbrauch zur Produktion von Glucose und Harnstoff	52
4.	DISKUSSION	53
4.1.	Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion	53
4.2.	Stoffwechsel	58
4.2.1.	Gluconeogenese in Abhängigkeit von verschiedenen Substraten und Perfusionsmedien	58
4.2.2.	Harnstoffproduktion der isoliert perfundierten Leber	61
4.3.	Perfusionsmedien	63
5.	Zusammenfassung	65
Literaturverzeichnis		67

I. EINLEITUNG

1.1. Zur historischen Entwicklung der Leberperfusion

Die Perfusion isolierter Organe findet in neuerer Zeit auf Grund verschiedener Vorteile eine verbreitete Anwendung. Einerseits ist das zu untersuchende Organ den Einflüssen des Gesamtorganismuses entzogen, andererseits werden die Nachteile, die bei der Verwendung von Gewebsschnitten oder Zellfraktionen auftreten, vermieden. Die morphologische Organisation und die Kreislaufverhältnisse gleichen weitgehend den Verhältnissen in vivo und ermöglichen Rückschlüsse auf physiologische Verhältnisse, während die Komplexität durch die Untersuchung nur eines Organes genügend eingeschränkt ist.

Die isolierte Leberperfusion ist seit mehr als 100 Jahren bekannt, wurde jedoch bis 1941 bevorzugt an größeren Spezies (Hunden, Katzen, Kaninchen) durchgeführt. Bernard (1866) wandte als einer der ersten diese Methode an, 1890 folgte Jacobj und 1903 Brodie, dessen Anregungen auch heute noch ihre Bedeutung haben. Zum Beispiel schlug er vor, heterologes Blut zu verwenden und nahm Stellung zum Problem der in situ- oder extracorporalen Perfusion isolierter Organe, wobei er sich eindeutig für die in situ Perfusion aussprach.

In neuerer Zeit wurde die Methode der isolierten Leberperfusion von Lundsgaard und Nielson (1936) aufgegriffen und erstmals durch Corey und Britton (1941) sowie Trowell (1942) auf die Rattenleber übertragen. Systematische Forschung auf diesem Gebiet setzte jedoch erst ein, nachdem die Arbeitskreise um Miller (1951) und Brauer (1951) standardisierte Perfusionstechniken entwickelt hatten.

Während Miller noch heparinisiertes Rattenblut über die Pfortader perfundierte, verwendete Schimassek (1962) bereits ein halbsynthetisches Medium (Salzlösung, Rinderalbumin und gewaschene Rindererythrozyten).
Durch Scholz und Bücher (1965) wurde erstmals eine hämoglobinfreie Leberperfusion durchgeführt und die Komplexität der Perfusion weiter eingeschränkt.
Die bisherigen Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber beschäftigten sich vor allem mit vorwiegend qualitativen Untersuchungen des Lebermetabolismus, weitere quantitative Aspekte, zum Beispiel physiologische Verhältnisse des Sauerstoffverbrauches wurden wenig beachtet.
Auch der Einfluß verschiedener moderner Perfusionsmedien auf die Physiologie und Biochemie der Leber wurde erst sehr wenig untersucht.

Das Ziel dieser Arbeit soll es deshalb sein, die quantitative Verhältnisse des oxidativen Metabolismus und des Sauerstoffverbrauchs, sowie den Einfluß verschiedener Perfusionsmedien auf diese Funktionen der Leber zu untersuchen.

1.2. Perfluorcarbonlösungen als Erythrozytenersatz

Die hohe Löslichkeit von Perfluorcarbonen für Sauerstoff und Kohlendioxid führte Ende der sechziger Jahre zu ersten Versuchen, PFC Emulsionen als Blut- bzw. Erythrozytenersatz zu verwenden.
Sloviter (1967) perfundierte damit erfolgreich Rattengehirne, Geyer (1968) und Clark (1970) erreichten gute Ergebnisse, als sie vorübergehend das gesamte Blut von Ratten bzw. von Hunden durch PFC-Emulsionen ersetzten.
Durch die unterschiedlichen Herstellungsmethoden bedingt waren allerdings Ergebnisse anderer Untersucher weniger gut. Die Entwicklung standardisierter Methoden bei der Produktion der Emulsionen brachte dann weitere Fortschritte.
Mit Fluosol 43 wurde ein Präparat industriell hergestellt, das gute Ergebnisse bei Perfusion isolierter Organe (Novakova et al. 1975) brachte.

Nachteile früher hergestellter Lösungen wie hohe Toxicität durch Partikelgrößen über 0,4 µm (Fujita et al. 1971) oder Gasembolien durch hohen Dampfdruck (Clark et al. 1975) konnten bei dieser Emulsion vermieden werden. Die hohe Halbwertszeit dieser Lösung von 895 Tagen schloß jedoch eine Anwendung beim Menschen aus.

Mit Fluosol DA wurde deshalb eine Emulsion entwickelt, für deren Bestandteile eine Halbwertszeit von lediglich 7.3 bzw. 68.8 Tagen ermittelt wurde.

Die Wirkung dieses Mediums auf den oxidativen Metabolismus der Leber im Vergleich zu anderen Perfluorcarbonlösungen und erythrozytenhaltigen Perfusionsmedien war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

2. Methodik

2.1. Leberperfusion

2.1.1. Operationstechnik

Bei den meisten der Versuche wurde die Leber in situ perfundiert. Dadurch wurden folgende Nachteile der total isolierten Leber vermieden: Die beträchtliche Traumatisierung bei der Entfernung aus dem umgebenden Gewebe, die relativ unnatürliche Lagerung in einer Perfusionskammer mit den daraus folgenden Durchblutungsstörungen und das Eindringen von Paraffin in die Perfusionslösung bei Lagerung der Leber im Ölbad (Reerink, 1972). Trotz gewisser Vorteile der totalen Isolation (bessere Sterilität, größere Unabhängigkeit von extrahepatischen Faktoren) erwies sich die "in situ" Perfusion für unsere Fragestellung als günstiger, wie die Kontrollversuche mit totaler Isolation zeigten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1:
Sauerstoffverbrauch verschiedener Rattenlebern in Abhängigkeit von der Operationstechnik

	total isoliert	" in situ "
O_2 Verbrauch ($ml\ O_2/(min \times 100g)$)	3,40 ± 0,44	6,51 ± 0,35
n	5	9

Der O_2 Verbrauch war bei den "in situ" perfundierten Lebern signifikant höher als bei den total isolierten ($P \leq 0.001$).

2.1.1.1. Operationsverlauf

Zum Narkotisieren wurde den Tieren nach Betäubung mit Äther eine Lösung von Alpha-Chloralose in Diäthylurethan intrapertioneal injiziert. Der Vorteil dieser Narkose liegt in der guten Erhaltung der Kreislaufreflexe (Hanriot, Richet 1897, Molnar et al. 1964). Es wurden nach Angaben von Lutz (1966) 70 mg/kg Körpergewicht Chloralose injiziert, dabei kam eine 7%-ige Lösung zur Anwendung, die mit Hilfe der

4-fachen Menge Urethan in Aqua dest. gelöst wurde.
Nach der Narkoseeinleitung wurde das Abdomen median eröffnet und die Darmschlingen wurden samt Magen zur Seite geklappt. Anschließend wurde der Ductus choledochus freipräpariert, vorsichtig inzidiert und ein Polyäthylenschlauch mit Stahlkanüle eingeführt. Der Schlauch wurde mit einer vorher gelegten Ligatur fixiert. Danach erfolgte die Präparation und Freilegung der Vena portae und Vena cava inferior.
Um beide wurden jeweils zwei lockere Ligaturen gelegt und die Seitenäste (Vena mesenterica superior, Vena lienalis und Venae renales)abgebunden. Dann wurde die V. portae mittels der distalen Ligatur unterbunden und zwischen V. mesenterica sup. und V. lienalis inzidiert. Der anschließend eingeführte Polyäthylenschlauch (1,5 mm Ø innen, 2,5 mm Ø außen) mit kurzem Kanülenrohr (1,6 mm Ø außen) wurde durch die obere Ligatur fixiert.
Die anschließende Injektion von 1500 USP.E. Heparin (Liquemin Roche), gelöst in 2 ml 0,9 %NaCl-Lösung sollte Koagulationen verhindern. Die V. cava inferior wurde nun ebenfalls unterbunden und in Höhe der Nierenvenen inzidiert. Nach der Einführung eines gleichartigen Polyäthylenschlauches mit einer Kanülenspitze von 2,2 mm Durchmesser (außen), erfolgte dessen Fixation mit der oberen Ligatur. Danach wurde das Perfusionssystem angeschlossen und die Perfusion wurde mit einem Zeitvolumen von 5 - 10 ml/min begonnen.
Der Thorax wurde nun mit einem Scherenschlag parasternal eröffnet, die V. cava inf. oberhalb des Diaphragmas abgebunden und der Kreislauf des Tieres durch Eröffnen der Herz-Ventrikel aufgehoben. Bei den Versuchen mit total isolierter Leber wurde dann die Leber vorsichtig freipräpariert und in das Perfusionsgefäß überführt.

Die Perfusionsstromstärke wurde nach Abbinden der oberen Hohlvene langsam auf den gewünschten Anfangswert gesteigert. Um während der Hypoxie gebildete Metaboliten und vasoaktive Stoffe zu entfernen, verwarfen wir die ersten 10 ml des venösen Perfusats.
Die Operation dauerte ca. 15 Minuten, die Dauer der Hypoxie betrug dabei 2 - 3 Minuten (Abbinden d. V. portae bis zum Anschluß an das Perfusionssystem).
Die Veränderungen des Lebergewebes während dieser kurzen Hypoxie sind nach Grunst (1967) vollständig reversibel.

2.1.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Wistar-Ratten eines Inzuchtstammes aus der Zucht des Physiologischen Institutes Würzburg. Es wurden Tiere mit einem Gewicht von 190 g bis 420 g, vorwiegend jedoch von 190 bis 240 g verwendet. Die Ratten erhielten "Fuka"-Standardnahrung (Fuka-Kraftfutterfabrik, R. Fundel KG, Ulm/Donau) und Wasser ad libitum. Bei den meisten Versuchen wurde den Tieren 24 Stunden vor der Operation die Nahrung entzogen, um eine glykogenfreie Leber zu erhalten. Das durchschnittliche Leberfeuchtgewicht betrug dann 38,60 $\pm$ 0,69g / 1000g Rattengewicht (n = 112).

Tabelle 2:

Fuka-Standardnahrung

Rohprotein	19,0 %
Rohfett	4,5 %
Rohfaser	6,0 %
Rohasche	7,5 %
Wasser	12,0 %
verdl. Protein/Kg	167 g

2.1.3. Perfusionsmedien

Die verwendeten Perfusionslösungen und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 3 aufgeführt.
Das mittlere Molekulargewicht für Dextran lag bei 60000, für das Hydroxyäthyl bei 250 000.
Der pH der Lösungen war durch die Verwendung des Bicarbonatpuffers auf 7,4 eingestellt.
Hämatokrit und Sauerstoffgehalt sind in Tabelle 5 angegeben. Rindererythrozyten wurden verwendet, da sie nur wenig agglutinieren und außerdem einen geringeren Durchmesser als Rattenerythrozyten haben (Schimassek, 1963).
Das mit Heparin versetzte Rinderblut wurde frisch vom Schlachthof geholt, für das Schimassek-Perfusionsmedium wurden die Erythrozyten 4-mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, das Blut für die anderen Lösungen mit einem Filter von 20 µm Porengröße (Typ 0982 Fa.Schleicher u. Schüll, Dassel) vor dem Versuch gereinigt.
Die Partikel der Fluosolemulsion hatten eine durchschnittliche Partikelgröße von 0.1µm. Der onkotische Druck lag bei 2.5 kPa (= 20 mm Hg).
Der Fluosollösung wurde statt HÄS Dextran zugesetzt, um Störungen der Glucosebestimmungen durch Stärkeverwertung zu vermeiden.

Tabelle 3:

Zusammensetzung der Perfusionslösungen

Bezeichnung	Kolloidosmotisch wirksame Bestandteile bzw. O_2-Träger	Elektrolyte	Firma
HÄS-Lösung	Rinderblut mit Heparin : 35 ml HÄS : 60 g/l	Tyrode : 65 ml mit: Na+ : 137 mM/l K+ : 4 mM/l Ca++ : 2,8 mM/l Mg++ : 1,0 mM/l Cl- : 120,3mM/l HCO_3^- : 24,1mM/l $H_2PO_4^-$: 0,4mM/l	HÄS: Fresenius Homberg v.d.H
Dextran-lösung	Rinderblut mit Heparin : 35 ml Dextran 60:60g/l	Tyrode : 65 ml Elektrolyte : siehe oben	Dextran 60: Knoll, Ludwigshafen
Pluronic-lösung	Rinderblut mit Heparin : 35 ml Pluronic F 108 : 30g/l	Tyrode : 65 ml Elektrolyte : siehe oben	Pluronic F 108 BASF-Wyandotte Corp. MichiganUSA
Schimassek-Perfusions-medium	gewaschene Rindererythrozyten : 24 ml Rinder-albumin :26 g/l	Tyrode : 120 ml Elektrolyte : siehe oben	Rinderalbumin Bovine Alb. Fraktion V, Powder,Charge YL 0470 Welding & Co., Hamburg
Fluosol DA 20 % -Dextran	Perfluordecalin =FDC : 140g/l Perfluortripropylamin =FDPA : 60 g/l Pluronic F-68 : 27 g/l Ei-Phospholipid : 4 g/l Glycerin:8 g/l Dextran 60 : 30g/l	Na+ : 92,1mM/l K+ : 3,6mM/l Mg++ : 1,5mM/l Cl- : 88,9 mM/l HCO_3^- : 10,0 mM/l	Fluosol DA Green Cross Corp. Osaka, Japan

Entsprechend der Fragestellung wurden 100 ml der Medien, 2 m M Pyruvat (Anfangskonzentration 20 mM/l), 300 mg Aminosäuren (Aminosol 10 %, Vitrum ^{R}, Fa. Deutsche Kali GmbH) oder 3 ml Fettsäure (= 0,6mMol) in Form von Na-Octanoat (Fa. Schwarz-Merck AG, München) zugesetzt.

Tabelle 4:
Zusammensetzung der Aminosäurenlösung

Arginin	0,31 g / 100 ml
Histidin	0,23 g / 100 ml
Methionin	0,25 g / 100 ml
Lysin	0,70 g / 100 ml
Tryptophan	0,11 g / 100 ml
Phenylalanin	0,47 g / 100 ml
Threonin	0,31 g / 100 ml
Valin	0,63 g / 100 ml
Leucin	0,93 g / 100 ml
Isoleucin	0,49 g / 100 ml
andere +Peptide	5,57 g / 100 ml

Bei den hämoglobinhaltigen Medien hing der Sauerstoffgehalt weitgehend vom Hämatokrit ab (siehe Tabelle 5). Mit Fluorcarbon als hämoglobinfreiem Medium wurde immerhin ein O_2-Gehalt von fast 4 ml O_2/100 ml erreicht. Dennoch war der Sauerstoffgehalt signifikant niedriger als bei anderen Perfusaten (P jeweils $\leq$ 0.001). Der Sauerstoffpartialdruck war dagegen signifikant höher als bei den anderen Medien (P jeweils $\leq$ 0.001).

Tabelle 5:
Arterieller Hämatokrit (HKT), Sauerstoffpartialdruck (POA) und O_2-Gehalt/100 ml (AG) der verschiedenen Medien

	n	HKT (%)	POA (mm/Hg)	AG(mlO_2/dl)
Dextran	13	12,7±1,2	301,1±22,1	6,52±0,26
Schimassek- M.	9	13,6±0,5	379,0±19,6	8,02±0,26
Pluronic	32	12,9±0,4	316,8±10,4	6,00±0,12
HES	9	11,7±0,8	345,1±12,0	5,84±0,17
Fluorcarbon	25	0	495,6±7,7	3,95±0,07

2.1.4. Perfusionsapparatur

Das Perfusat wurde durch einen Diffusionsoxygenator mit Sauerstoff gesättigt (Scholz et al. 1973), während sich die gebildete CO_2-Konzentration der des Gasgemisches anpaßte (95 % O_2, 5 % CO_2).
Dabei durchlief das Perfusionsmedium einen für Gase permeablen Schlauch (9 m Länge, 2 mm Innendurchmesser, 0,2 mm Wandstärke), an dem das Gasgemisch im Gegenstrom vorbeigeleitet wurde.
Durch die Länge des Schlauches gelang es, die Sauerstoffsättigung von der Durchflußgeschwindigkeit des Perfusats weitgehend unabhängig zu machen.
Die Temperatur wurde durch den umgebenden Wassermantel konstant auf 37° C gehalten. Nach dem Verlassen des Oxygenators passierte die Perfusionslösung zunächst einen Filter mit einer Porengröße von 50 µm (Fa. Schleicher & Schüll GmbH, 3354 Dassel), um eventuell vorhandene Thromben oder Verunreinigungen aufzufangen. Anschließend wurde das Perfusat nochmals in mehreren Schlingen durch ein Wasserbad von 37° C geleitet.
Vor der Pfortader war noch ein Windkessel eingeschaltet, der zumeinen als Blasenfänger diente, zum anderen die Verbindung mit dem Elektromanometer herstellte (Meßkopf 23 Db, Statham Corp.).
Bei etlichen Versuchen wurden pH-, Sauerstoff-, und CO_2-Elektroden in den arteriellen Teil des Kreislaufes eingeschaltet, die eine kontinuierliche Kontrolle erlaubten.
Das Perfusat verließ die Leber über die in der V. cava inferior liegenden Kanüle, passierte eine durch einen Wassermantel auf 37° C temperierte pH-, O_2- und CO_2-Elektrode und wurde in einem ebenfalls durch einen Wassermantel auf 37° C erwärmten Gefäß aufgefangen und dort mittels eines Rührers durchmischt.
Mit Hilfe einer Rollenpumpe erreichte das Perfusat wiederum den Oxygenator.

Durch einen Rührmotor und einen von oben eingehängten, in Polyäthylen gekapselten Mischstab wurde eine schnelle Durchmischung zugeführter Substrate erreicht. Die Probeentnahmen erfolgten auf der arteriellen und der venösen Seite durch jeweils zwischengeschaltete T-Stücke.

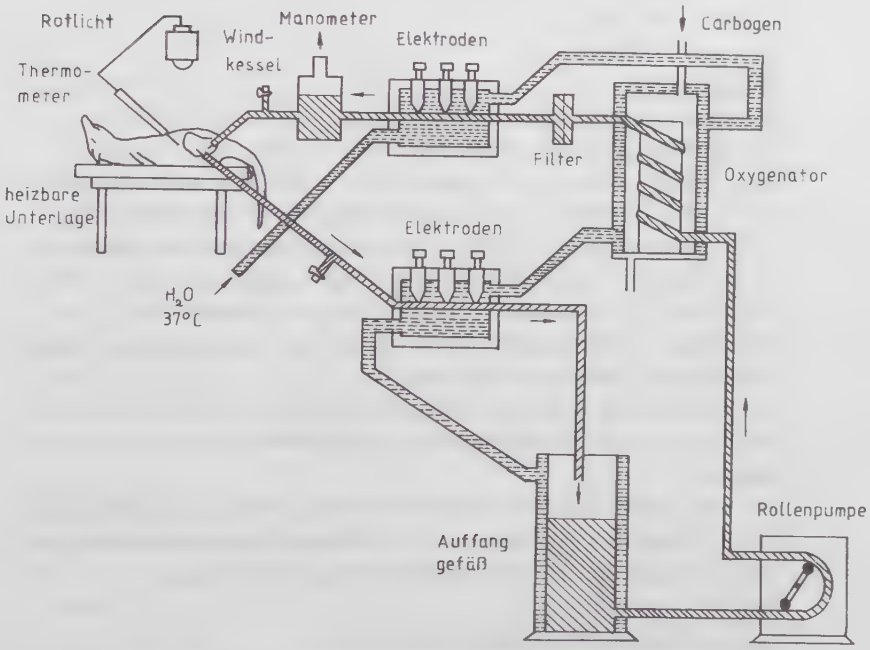

Abb. 1:

Perfusionsapparatur

Das Abdecken der Leber mit einer Plastikfolie verhinderte die Austrocknung, während die Temperatur in der so geschaffenen Kammer durch ein eingebrachtes Thermometer und einer damit verbundenen Infrarotlampe, sowie durch die erwärmbare Unterlage konstant auf 37 ^{o} C gehalten wurde.
Ein Schreiber (Multi-Pen Recorder, Fa. Rikadenki, Japan) registrierte kontinuierlich Perfusionsgeschwindigkeit, Perfusionsdruck, Perfusionszeit, venösen (arteriellen) pH, pCO_2 und pO_2.

Variationen:
Eine genügende Sauerstoffsättigung konnte auch durch Durchperlen des Perfusats im Vorratsgefäß mittels einer Glasfritte (G. 2, Fa. Schott, Mainz) erreicht werden. Bei dieser Methode mußte allerdings ein Entschäumer zugesetzt werden, um ein Überlaufen des entstehenden Schaumes zu verhindern. Bewährt hat sich dabei Bayer Silicone 100 % (Fa. Bayer, Leverkusen), während Bayer Entschäumer E (Fa. Bayer, Leverkusen) eine bessere Wirkung zeigte, jedoch eine starke Hämolyse hervorrief.
Die Verwendung eines Scheibenoxygenators hatte sich wegen der zu geringen erreichbaren Sauerstoffkonzentration nicht bewährt.
Bei den Versuchen mit extracorporaler Perfusion wurde dieselbe Apparatur verwendet, die Leber befand sich dabei in einem temperierten und abgedeckten Gefäß.

2.1.5. Durchführung der Experimente
Die Ratte wurde nach dem Ende der Operation auf den Experimentiertisch überführt und die Perfusionsgeschwindigkeit langsam auf die gewünschte Höhe eingestellt.
Nach Einstellung eines steady state des venösen pH's und der venösen Sauerstoffkonzentration konnte die erste Probenentnahme erfolgen. Venöse und arterielle Abnahme erfolgten möglichst gleichzeitig. Die Probenwurde im Abstand von 7,5 Minuten entnommen.

Das Perfusat wurde luftfrei über die T-Stücke in Spritzen aufgezogen und sofort mit Gummistopfen verschlossen, um Veränderungen durch Diffusion möglichst gering zu halten. Sauerstoffgehalt, pO_2, pCO_2 und pH der venösen Probe wurden sofort bestimmt, die der arteriellen unmittelbar anschließend.
Während des Versuches wurde zur Erzeugung einer metabolischen Acidose und zur Überprüfung der Sauerstoffextraktion der Leber die Perfusionsgeschwindigkeit in Stufen auf 5 ml/min reduziert, ebenso am Ende des Versuches.

Jede Änderung der Versuchsbedingungen, wie Zugabe von Pyruvat, Glucose, Aminosäuren, Fettsäuren oder Perfusionsgeschwindigkeitsänderungen erfolgte unmittelbar nach einer Probenentnahme,um bis zur nächsten Abnahme wieder einen stationären Zustand zu erreichen.
Im allgemeinen wurde jeweils nur ein Parameter verändert.
Neben den Blutgasen wurde auch der Hämatokrit unmittelbar nach der Probenentnahme gemessen.
Hämoglobingehalt, Enzyme und Metaboliten wurden nach Versuchsende in den Proben bestimmt.

2.2. Analytik

2.2.1. Sauerstoffmessung

Der Sauerstoffpartialdruck wurde mit einer Platinelektrode gemessen, während der Sauerstoffgehalt elektrochemisch mit dem Gerät "Lex O Con" bestimmt wurde.

2.2.1.1. Messung mit dem Lex O_2 Con-Gerät

Die Messung des Sauerstoffgehaltes erfolgte bei diesem System mittels einer galvanischen Zelle. Die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber der Methode nach van Slyke waren zum einen die einfachere Handhabung und zum anderen die schnellere Durchführung der Messung (Dauer der Messung ca. 3 Minuten). Die Exaktheit entsprach der Bestimmung nach van Slyke, wie Valery und Mitarbeiter (1972) nachweisen konnten.

Das Gerät bestand aus einem elektronischen Rechenteil, einer Meßzelle und einem mit destiliertem Wasser gefüllten Kreissystem, dem Scrubber.
Der Scrubber wurde von einem sauerstofffreien Trägergas (N_2, H_2, CO) durchperlt, um damit einen kontinuierlichen Gas- und Wasserstrom zu erzeugen und ein sauerstofffreies bzw. -armes Medium zu schaffen.
In den Scrubber wurde das Perfusionsmedium gespritzt, dessen Sauerstoff der Gasstrom zur Meßzelle transportierte. Nach Bindung der Sauerstoffmoleküle an eine Cadmium Anode setzten diese pro Molekül 2 Elektronen frei.
Die Gesamtzahl der Elektronen wurde dann durch elektronische Impulszählung gemessen, durch den Rechenteil in Volumen % umgerechnet und digital auf 0,1 Volumen % genau angegeben.
Die von P. Hersch (US Patent 3.223.597) entwickelte Meßzelle zeichnete sich durch eine hohe Temperaturunempfindlichkeit aus, die einen Thermostaten unnötig machte.
Lange Grenzwertstabilität, hohe Spezifität für Sauerstoff und kurze Bestimmungszeiten waren weitere Vorteile bei Gebrauch des Gerätes.
Die Meßzeit betrug bei unseren Versuchen 2 - 3 Minuten, um die Genauigkeit der Messungen zu gewährleisten, mußte der Scrubber jedoch nach 6 - 8 Messungen gespült werden und eine Kontrollmessung durchgeführt werden.
Das Gerät wurde mit einer bekannten Menge Sauerstoff geeicht, (20 µl Raumluft, Korrektur des Sauerstoffgehaltes nach einer Eichtabelle nach Messung des Luftdrucks, Luftfeuchtigkeit und Temperatur).

2.2.1.2. Messung mit der Platinelektrode

Der im Perfusionsmedium physikalisch gelöste Sauerstoff wurde amperometrisch mit einer Platinelektrode (Fa. Eschweiler, Kiel) bestimmt. Die Elektrode war nach dem bekannten Clarkschen Prinzip (Clark, 1956) aufgebaut.
Die Eichungen erfolgten mit einem wasserdampfgesättigten

N_2/CO_2-Gasgemisch (87,7% N_2, 12,3% CO_2) zur Bestimmung des Nullpunktes und einem wasserdampfgesättigten O_2-haltigen Gasgemisch (20% O_2, 3,5% CO_2, 76,5% N_2) zur Empfindlichkeitseinstellung. Diese Gasgemische dienten auch der Eichung der p CO_2 Elektrode (s.u.). Nach Ende des Versuches wurde sowohl Nullpunkt als auch Empfindlichkeit nochmals kontrolliert. Die Messungen erfolgten im Combianalysator (Fa.Eschweiler,Kiel) zusammen mit der pH und pO_2 Messung bei einer konstanten Temperatur von 37° C.
Auch die in den Perfusatstrom eingeschalteten Elektroden befanden sich in einem gemeinsamen Analysengefäß, die Werte wurden hier kontinuierlich über einen Schreiber registriert.

2.2.2. CO_2- und pH-Messung

Die pCO_2 und pH Messungen erfolgten wie beschrieben in dem Combianalysator. Der pH wurde mit einer Glaselektrode der Fa. Eschweiler, (Kiel) bestimmt. Die Eichung erfolgte dabei mit den Standardpufferlösungen nach DIN 19266.
Das Asymetriepotential wurde mit einem Puffer von 6,84 abgeglichen, die Steilheit der Kennlinie wurde durch einen Puffer vom pH 7,38 reguliert. Der pCO_2 wurde mit einer Ganzglaselektrode nach Gleichmann, Lübbers et al. (1960) der Fa. Eschweiler Kiel, bestimmt. Die Elektrode wurde mit zwei wasserdampfgesättigten Gasgemischen geeicht (s.o.).
Die Asymetriepotentialeinstellung erfolgte über ein Gasgemisch mit 3,5 Vol. % CO_2, die Empfindlichkeitseinstellung über ein Gasgemisch mit 12,3 Vol. % CO_2.

2.2.3. Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen

Alle Bestimmungen erfolgten mit Mikromethoden.
Die Konzentrationen wurden alle photometrisch nach folgender Formel bestimmt:

$$C = \frac{MG}{\epsilon x d x 10} \times \frac{V}{v} \times F \times \Delta E \quad (\text{mg} / 100\ \text{ml})$$

MG = Molekulargewicht
ε = Substanzspez. Extinktionskoeffizient
d = Schichtdicke d. Küvette (1 cm)
V = Summe d. eingebrachten Volumina
v = Eingebrachtes Vol. d. Perfusionsmediums
F = Verdünnungsfaktor (z.B. nach Enteiweisung)
Δ E = Extinktionsdifferenz

Vor jeder Meßreihe wurde außerdem die "Eichkurve" rechnerisch aus Lösungen bekannter Konzentrationen bestimmt. Die Standardabweichung des Steigungswertes durfte dabei höchstens 8 % betragen. Außerdem erfolgten jeweils Überprüfungen über einen mitgeführten Kontrollwert.

2.2.3.1. Glucose

Die Glucosebestimmungen erfolgten enzymatisch nach der GOD-Perid^{R}-Methode (Fa. Boehringer, Mannheim). Die Glucosemenge wurde dabei mit dem spezifischen Enzym Glucoseoxydase (GOD) und einer anschließenden Farbstoffreaktion bestimmt.

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightleftharpoons{GOD} \text{Gluconsäure} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{ABTS} \xrightleftharpoons{POD} \text{Farbstoff} + H_2O$$

Die Farbstoffkonzentration ist dabei der Glucosekonzentration proportional und konnte photometrisch bestimmt werden (z.B. bei 420 nm).
Die Bestimmung erfolgte mit einer Mikromethode ., die Proben wurden dabei enteiweißt und zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 20 µl (statt 100 µl) in Reagenzgläser pipetiert und dann 1000 µl (statt 5 ml) des Puffer-Enzym-Chromogen-Gemisches hinzugefügt. Nach einer Inkubation von ca. 30 min. wurde dann die Extinktion gegen Wasser gemessen.

2.2.3.2. Harnstoff

Die Bestimmungen erfolgten mit der Biochemica-Test-Combination Harnstoff der Fa. Boehringer, Mannheim. Katalysiert durch das Enzym Urease wurde Harnstoff unter H_2O Verbrauch

zu Ammoniumcarbonat gespalten.

$$NH_2 - CO - NH_2 + H_2O_2 \xrightleftharpoons{\text{Urease}} (NH_4)_2CO_3$$

Die entstandenen Ammoniumionen reagierten mit Phenol und Hypochlorid unter Bildung eines blauen Farbstoffs, dessen Farbinsität der Harnstoffkonzentration proportional war. Die photometrische Messung erfolgte bei 550 µm.

Auch hier wurde die Bestimmung mit einer Mikromethode vorgenommen. 40 µl (statt 200 µl) der verdünnten Probe (1:10 mit 0,9 % NaCl-Lösung) wurden mit 20 µl Ureaselösung gemischt, verschlossen und 10 min. im Wasserbad bei 37° C aufbewahrt.
Anschließend erfolgte die Zugabe von je 1000 µl (statt 5ml) der Plenol- und Hypochloridlösung.
Nach 15 min. Reaktionszeit erfolgten dann die Messungen.
Als Leerwert diente eine Probe ohne Perfusionsmedium.

2.3.1. Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Groß-Rechenanlage (AEG-Telefunken TF 440) des Rechenzentrums der Universität Würzburg und der programmierbare Rechner TI - 59 der Fa. Texas Instruments benutzt.
Folgende Werte wurden aus den gemessenen Parametern berechnet.

1. Relative Perfusionsstromstärken:

$$I_R \text{ (ml / (100 g x min))} = \frac{I \text{ (ml / min) x 100}}{\text{Lebergewicht (g)}}$$

2. O_2 Verbrauch:

$$V \text{ (ml } O_2 \text{ / (min x 100 g Lebergewicht))} = (AG\text{-}VG) \times I_R / 100$$

AG = arterieller O_2-Gehalt (ml O_2)
VG = venöser O_2-Gehalt (ml O_2)

3. O_2-Angebot:

$$A \text{ (ml } O_2\text{/(min x 100 g Lebergewicht))} = (AG) \times \frac{I_R}{100}$$

4. O_2- Extraktion:

$$E\ (\%) = V \times 100 / A$$

5. Hämoglobingehalt:

$$Hb\ (g/dl) = (0{,}33 \times HK_{art} + 0{,}33 \times HK_{ven}) : 2$$

Der Hämatokrit wurde bei jeder Probeentnahme bestimmt, die Beziehung zum Hb-Gehalt beruhte auf einem mittleren Hb-Gehalt der Erythrozyten von 33 g Hb/dl.
Die Kontrolle erfolgte bei jedem Versuch durch dreimalige Bestimmung des Hb-Gehaltes nach der Cyanmethode.

6. Produktion der Metaboliten (µmol/100 g LG x min)

$$MP = \frac{C_1 - C_2}{MG \times 1000} \times \frac{V_1 + V_2}{2 \times 100} \times \frac{100}{LG} \times \frac{1}{t}$$

C_1, C_2 = Metabolitenkonzentration bei erster und zweiter Abnahme (mg/100 ml)

MG = Molekulargewicht

V_1, V_2 = Volumen der gesamten Perfusatmenge bei erster und zweiter Abnahme

LG = Lebergewicht

t = Zeit (min.)

2.3.2. Statistische Berechnungen

Bei den Meßreihen wurden der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}=\frac{\Sigma(x)}{n}$), Standardabweichung (s) und Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) bestimmt.

Zur Berechnung der Standardabweichung wurde folgende Formel verwendet:

$$s=\sqrt{\frac{\Sigma(x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert

x = Einzelwert

n = Anzahl der Einzelwerte

Die Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) berechnete sich aus der Standardabweichung wie folgt.

$$s_{\bar{x}}=\frac{s}{\sqrt{n}}$$

Bei den Ergebnissen wurden jeweils der arithmetische Mittelwert ± der Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.
Zum Vergleich zweier Mittelwerte bei paarweiser Anordnung der Meßwerte wurde der t-Test durchgeführt.

$$t = \frac{\bar{x}}{s_{\bar{x}m}} \qquad \gamma = n-1$$

$\bar{x}$ = Mittelwert der Differenzen
$s_{\bar{x}m}$ = Standardabweichung des Mittelwertes der Differenzen
γ = Zahl der Freiheitsgrade

Die Irrtumswahrscheinlichkeit konnte dann aus den Tafeln der Student-Verteilung bestimmt werden (z.B. Documenta Geigy:Wissenschaftliche Tabellen 6. Auflage, Basel 1960). Der Unterschied zwischen beiden Meßreihen galt als signifikant, wenn die Nullhypothese (d.h. die Annahme beide Mittelwerte seien gleich) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (P) von weniger als 5 % abzulehnen war.
Beim Vergleich der Mittelwerte unabhängiger Meßreihen wurde t berechnet nach:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{sd} \qquad \gamma = n_1 + n_2 - 2$$

γ = Zahl der Freiheitsgrade
$\bar{x}_1, \bar{x}_2$ = arithmetischer Mittelwert der Meßreihen

$$sd = \sqrt{\frac{SQ_1 + SQ_2}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}$$

$SQ = \sum(x-\bar{x})^2$ der jeweiligen Meßreihe
n = Anzahl der Einzelwerte

Auch hier galt der Unterschied der Mittelwerte als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) weniger als 5 % betrug.

3. Ergebnisse

3.1. Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion der Perfusionsmedien mit und ohne Zugabe von Pyruvat, Aminosäuren, Ammoniumchlorid und Fettsäuren

Die Leber gehört zu den Organen mit dem höchsten Sauerstoffverbrauch. Bei Ischämie ist sie in der Lage, 90 - 95 % des angebotenen Sauerstoffs zu extrahieren (Lutz, Schulze 1977, Lutz et al. 1978) um ihre Funktion aufrecht zu erhalten.
Bei erhöhtem Substratangebot für den Leberstoffwechsel steigt der Sauerstoffverbrauch der Leber an. Bereits Scholtholt (1970) konnte bei Hundelebern durch Aminosäurengabe eine erhebliche Steigerung des O_2-Verbrauches erreichen (von 1.99 ml/(minx100g) auf 3.38 ml O_2/(minx100g), die Werte lagen allerdings erheblich unter dem physiologischen O_2-Verbrauch.
Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion lassen sich jedoch auch durch Pyruvat- und Fettsäurengabe steigern, weiterhin zeigen sie eine erhebliche Abhängigkeit vom jeweiligen Perfusionsmedium, wie die folgenden Versuche zeigten.

3.1.1. O_2 Verbrauch in verschiedenen Medien

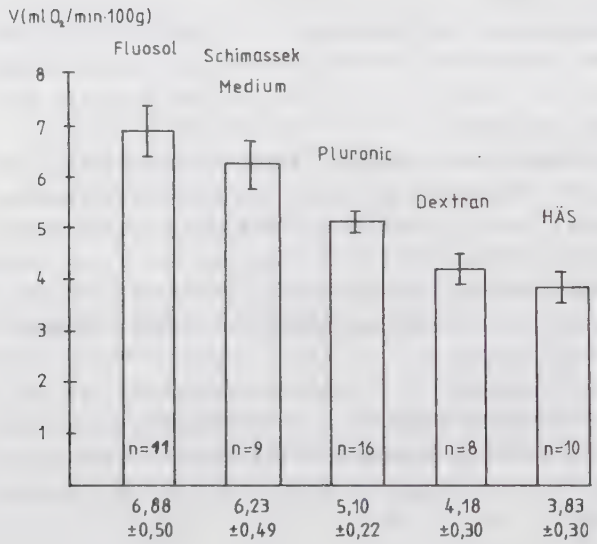

Abb.: 2

Sauerstoffverbrauch der isolierten Rattenleber bei Perfusion mit verschiedenen Medien.

Fluosol	Schimassek-M.	Plur	Dextran	HÄS
10,41	19,33	14,02	12,24	10,35
±1,10	±1,50	±1,03	±0,88	±0,68

Tabelle 6:

O_2 Angebot in verschiedenen Perfusionsmedien (ml O_2/(minx100g))

Der höchste O_2 Verbrauch ohne Substratgabe wurde bei den Versuchen mit Fluosol als Perfusionsmedium erreicht (s. Abb. 2) trotz des relativ niedrigen O_2 Angebots.
Der Unterschied zu dem Schimassek-Medium war jedoch nicht signifikant. Fluosol und Schimassek-Medium ergaben beide einen signifikant höheren O_2 Verbrauch gegenüber den anderen Medien.
(Fluosol-Plur $P \leq 0.01$ Fluosol-Dextran $P \leq 0.001$
Schimassek-M.-Plur $P \leq 0.05$ Schimassek-M.-Dextran $P \leq 0.01$
Fluosol-HÄS $P \leq 0.001$ Schimassek-HÄS $P \leq 0.001$)
Dextran- und HÄS-Medien zeigten keine signifikanten Unterschiede, Pluronic ergab dagegen einen signifikant höheren O_2 Verbrauch als diese beiden Medien (Pluronic-HÄS $P \leq 0,05$, Pluronic-HÄS $P \leq 0,01$).

3.1.2 O_2 Extraktion in verschiedenen Perfusionsmedien

Bei Fluosolperfusion wurde schon unter Normalbedingungen eine gegenüber den anderen Perfusionsmedien signifikant höhere O_2 Extraktion erzielt. (P jeweils ≤ 0.001)
Dies war sicher mit durch das relativ niedrige O_2 Angebot (siehe Tabelle 6) bedingt.
Allerdings wurden so hohe Werte erreicht, wie sie z.B. beim Schimassek Medium erst bei Hypoxie auftraten. Auch bei Hypoxie war die Extraktion signifikant höher, obwohl ein noch relativ hohes O_2 Angebot bestand (siehe Abb. 3).

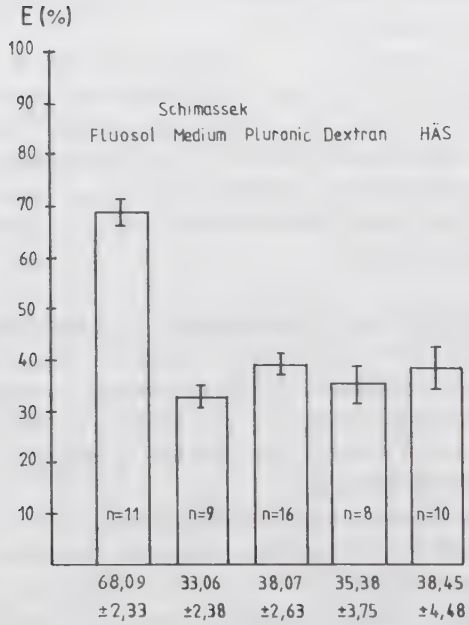

Abb. 3:
Sauerstoffextraktion der Rattenleber bei Perfusion mit verschiedenen Medien.

Die übrigen Medien zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Sauerstoffextraktion.
Bei Ischämie (Sauerstoffangebot siehe Tabelle 7) stieg bei allen Medien, außer dem Schimassek-Medium, die Sauerstoffextraktion der Leber auf Werte um 90% an (siehe Abb. 4).

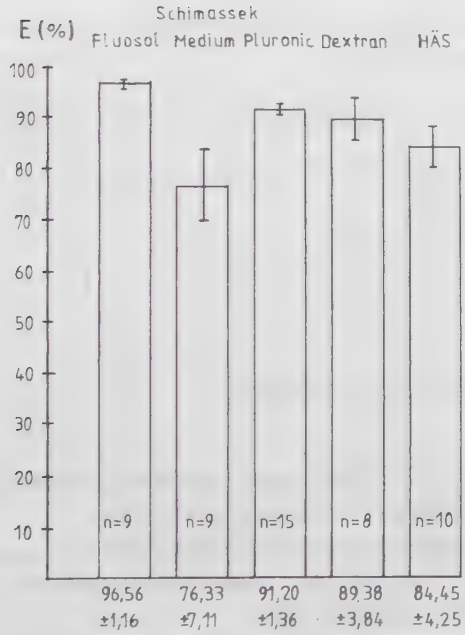

Abb. 4:

Sauerstoffextraktion der Rattenleber bei Perfusion mit verschiedenen Medien unter relativer Ischämie.

Die Sauerstoffextraktion war bei Fluosol signifikant höher als bei allen anderen Medien (P jeweils $\leq$ 0.02), lediglich zu dem Pluronicmedium war der Unterschied nicht signifikant.

Die relativ niedrige Extraktion bei dem Schimassek-Medium war sicher durch das relativ hohe Sauerstoffangebot bedingt (siehe Tabelle), das gegen alle anderen Medien signifikant erhöht war (Schimassek Med./Fluosol $P \leq 0.02$; - / Pluronic $P \leq 0.001$; - / Dextran $P \leq 0.001$, - / HÄS $P \leq 0.001$).

Das Sauerstoffangebot der anderen Medien unterschied sich nicht signifikant.

Medium:	Fluosol	Schimassek-Medium	Pluronic	Dextran	HÄS
O_2 Angebot ml O_2/(min x 100g)	2,19 ±0,32	3,52 ±0,32	2,01 ±0,20	1,80 ±0,21	1,97 ±0,17

Tabelle 7:

Sauerstoffangebot bei Ischämie.

3.1.3. Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Pyruvatgabe

Nach Pyruvatgabe (20 mMol/l) stieg bei allen Medien der Sauerstoffverbrauch und die Sauerstoffextraktion an (siehe Tabelle 8 und Abb. 5).

Nach Pyruvatgabe unterschied sich der Sauerstoffverbrauch der Medien nicht mehr signifikant, obwohl der Verbrauch im Pluronic-Medium erheblich niedriger als bei den beiden anderen Medien war. Dies ist wohl auf die größere Streuung zurückzuführen. Infolge des signifikant niedrigeren Sauerstoffangebotes bei Fluosolperfusion (vor Pyruvat : Fluosol/Pluronic $P \leq 0.01$; nach Pyruvat : Fluosol/Pluronic $P \leq 0.05$;

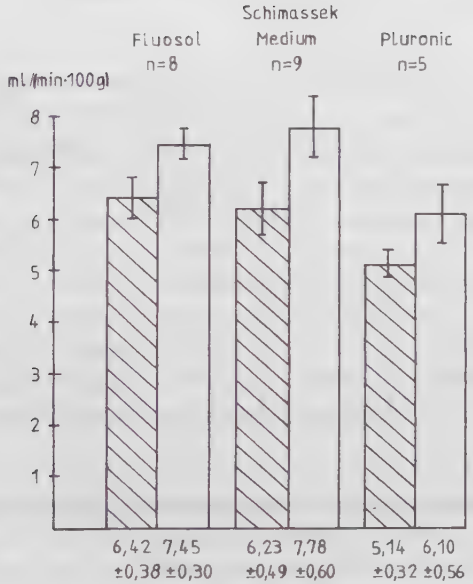

Abb. 5:

Sauerstoffverbrauch vor (▨) und nach (□) Gabe von 20 mMol/l Pyruvat bei verschiedenen Medien.

Fluosol/Schimassek Med. P jeweils ≤ 0.001) war die Sauerstoffextraktion gegenüber den anderen Medien vor und nach Pyruvatgabe erheblich höher (P jeweils ≤ 0.001). Interessant ist dabei, daß durch Steigerung des Sauerstoffbedarfs die Extraktion auf Werte anstieg, die sonst nur bei Ischämie erreicht wurden.

	Fluosol n = 8		Schimassek-Med. n = 9		Pluronic n = 5	
	$\dot{V}O_2$Ang. ($ml O_2$) / min×100g	O_2Extr. (%)	$\dot{V}O_2$Ang. ($ml\ O_2$) / min×100g	O_2Extr. (%)	$\dot{V}O_2$Ang. ($ml\ O_2$) / min×100g	O_2Extr. (%)
Kontroll-periode	9,18 ±0,68	70,5 ±1,6	19,33 ±1,50	33,1 ±2,4	13,19 ±0,80	39,2 ±2,4
Pyruvat-gabe	9,05 ±0,71	84,1 ±3,6	19,57 ±1,54	39,4 ±2,8	12,75 ±1,18	48,2 ±3,6

Tabelle 8:

Sauerstoffangebot, Sauerstoffextraktion vor und nach Pyruvatgabe

Obwohl bei dem Schimassek-Medium das O_2 Angebot gegenüber den anderen Medien vor und nach Pyruvatgabe signifikant höher war (P ≤ 0,02) unterschieden sich die Sauerstoffextraktionen der erythrozytenhaltigen Medien hier nicht signifikant.

3.1.4. Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Aminosäurengabe

Der Sauerstoffverbrauch nach Aminosäurengabe (300mg/dl) war (gemessen über einen Zeitraum von mindestens 20 min.) bei allen Medien signifikant höher als in der Kontrollperiode (Fluorcarbon $P \leq 0.001$, Pluronic $P \leq 0.001$, Dextran $P \leq 0.02$, HÄS $P \leq 0.01$). Schimassek-M. schied allerdings bei diesen Vergleichen aus, da sein Ausgangsgehalt an Aminosäuren bereits höher lag.
Die mit Fluorcarbon perfundierten Lebern hatten auch unter Aminosäurengabe einen signifikant höheren Verbrauch als die mit den anderen Perfusionsmedien versorgten.
(Fluosol - Pluronic $P \leq 0.05$, Fluosol - Dextran $P \leq 0.05$, Fluosol - HÄS $P \leq 0.002$).
Bei den anderen Medien war lediglich der Unterschied Pluronic - HÄS im Sauerstoffverbrauch der Leber signifikant ($P \leq 0.02$).
Entsprechend zum Sauerstoffverbrauch verhielt sich die Sauerstoffextraktion (siehe Tabelle 9).

Auch sie wurde durch Aminosäurengabe bei allen Medien gegenüber der Kontrollperiode signifikant gesteigert (Fluosol, Pluronic, Dextran $P \leq 0.001$, HÄS $P \leq 0.01$). Bei Fluosolperfusion stieg die Extraktion auf Werte, die sonst nur bei Hypoxie erreicht wurden. Der Unterschied zu den anderen Medien war signifikant ($P \leq 0.001$). Das Sauerstoffangebot zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede.

Durch Gabe von Aminosäuren zu den Perfusionsmedien ließ sich der Sauerstoffverbrauch erheblich mehr steigern als bei Gabe von Pyruvat. Dies geht aus den Werten der Tabelle 12a (S. 35) hervor.

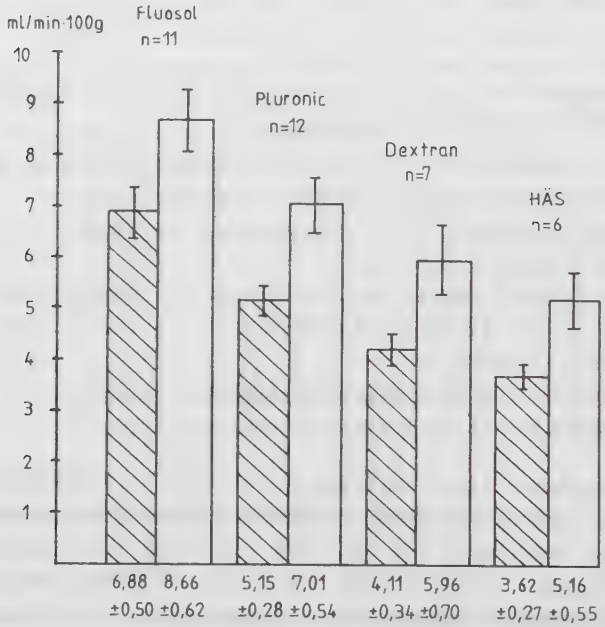

Abb. 6:

Sauerstoffverbrauch vor und nach Gabe von 300 mg/dl Aminosäuren bei verschiedenen Perfusionsmedien

(▨ Ausgangswert ☐ Verbrauch nach AS-Gabe)

	Fluosol n=11		Pluronic n=12		Dextran n=7		HÄS n=6	
	O_2Ang. *	O_2Extr. (%)	O_2Ang. *	O_2Extr. (%)	O_2Ang. *	O_2Extr. (%)	O_2Ang. *	O_2Extr. (%)
Kontroll-periode	10,41 ±1,10	68,09 ±2,33	14,18 ±1,22	39,26 ±3,22	12,39 ±1,01	34,57 ±4,29	9,56 ±0,84	40,00 ±6,02
AS-Gabe	10,03 ±1,18	89,79 ±3,34	13,32 ±1,33	59,95 ±3,70	11,83 ±1,17	52,00 ±5,63	9,39 ±1,07	58,25 ±8,11

* = (ml O_2/(min x 100g))

Tabelle 9:
O_2Angebot und O_2Extraktion bei verschiedenen Medien vor und nach AS-Gabe (300mg/dl)

3.1.5. Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Fettsäurengabe

Durch Fettsäurengabe (Na-Octanoat, 6 mM/l Perfusat) ließ sich der O_2 Verbrauch ebenfalls signifikant steigern (Fluosol $P \leq 0.001$ Schimassekmedium $P \leq 0.05$) wie die Abbildung 7 zeigt.

Fluorcarbon und das Schimassek-Medium unterschieden sich hier im O_2 Verbrauch nicht signifikant. Die Sauerstoffextraktion stieg bei beiden Medien ebenfalls signifikant an (Fluosol $P \leq 0.01$, Schimassek-Medium $P \leq 0.05$).
Nach Fettsäurengabe war der Unterschied in der Sauerstoffextraktion zwischen beiden Medien nicht signifikant (vergleiche Tabelle 10).

	O_2Extraktion(%) vor Fettsäuren	O_2Extraktion(%) nach Fettsäuren	O_2-Angebot (ml O_2/ (min x100g))	n
Fluosol	43,84 $\pm$3,38	57,95 $\pm$4,12	13,68 $\pm$1,15	6
Schimassek Medium	30,34 $\pm$3,35	51,31 $\pm$6,26	18,05 $\pm$1,58	5

Tabelle 10:

Sauerstoffangebot und Sauerstoffextraktion vor und nach Fettsäurengabe (6 mMol/l) bei verschiedenen Medien.

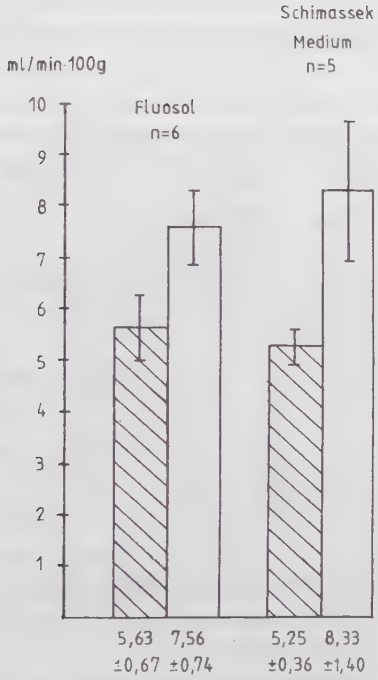

Abb. 7:

O_2 Verbrauch vor und nach Gabe von 6 mMol/l Fettsäuren bei Fluosol und Schimassek-Medium.
(Verbrauch vor FS Gabe schraffiert)

3.1.6. Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Arginin und Ammoniumchloridgabe

Bei einigen Versuchen der Pluronicreihe wurde versucht, den Sauerstoffverbrauch durch Arginin- (17 mMol/l) und Ammoniumchloridgabe (6 mMol/l) zu steigern (siehe Tabelle 11).

	O_2 Verbrauch-kontrolle (ml O_2/ (minx100g)	O_2 Verbrauch nach Arg/NH_4 Cl (ml O_2/ (minx100g))	O_2 Extr. Kontrolle (%)	O_2 Extr.(%) nach Arg/NH_4Cl
	4,90 ± 1,40	6,48 ± 0,63	40,98±4,91	56,88±4,62
O_2 Angebot	12,08±1,40	10,87±1,41	12,08±1,40	10,87±1,41
n	6	6	6	6

Tabelle 11:

Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion nach Arginin- (17 mMol/l) und Ammoniumchloridgabe (6 mMol/l).

Der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und der Sauerstoffextraktion war dabei über einen Zeitraum von mindestens 20 Min. signifikant (Verbrauch $P \leq 0.001$, Extraktion $P \leq 0.01$). Bei Gabe des Aminosäurengemisches war die Steigerung jedoch höher (siehe Kapitel 3.1.7.).

3.1.7. Vergleich der Wirkung von Pyruvat, Aminosäuren, Ammoniumchlorid und Fettsäuren auf den Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch der Medien wurde durch Fettsäuren am meisten gesteigert, gefolgt von Aminosäuren, NH_4Cl/Arginin und Pyruvat (Tabelle 12a). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, bis auf die signifikant niedrigere Steigerung des Verbrauchs bei Fluosol nach Pyruvatgabe gegenüber Fettsäuren- oder Aminosäurengabe ($P = 0.02$).

	Fluosol		Schimassek-Medium		Pluronic		Dextran		HÄS	
Pyruvat	0,96 ±0,23	9	1,55 ±0,26	9	1,54 ±0,31	5	--	-	--	-
Aminosäuren	1,78 ±0,18	11	--	-	1,86 ±0,28	12	1,91 ±0,59	7	1,54 ±0,36	6
Arg./NH_4Cl	--	-	--	-	1,58 ±0,23	6	--	-	--	-
Fettsäuren	1,93 ±0,25	6	3,08 ±1,18	5	--	-	--	-	--	-
		n		n		n		n		n

Tabelle 12a:

Steigerung des O_2 Verbrauches durch Pyruvat-Aminosäuren- und Fettsäurengabe bei den verschiedenen Medien.(ml O_2/(min×100g)

Die verschiedenen Medien zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Steigerung des Sauerstoffverbrauches bei Gabe desselben Substrates.
Die Sauerstoffextraktion verhielt sich entsprechend (siehe Tabelle 12b).

Die Steigerung der Sauerstoffextraktion bei Fluosolperfusion nach Aminosäurengabe war signifikant höher als die Steigerung nach Pyruvat ($P \leq 0.001$) oder Fettsäurengabe ($P \leq 0.02$).

	Fluosol	n	Schimassek Medium	n	Pluronic	n	Dextran	n	HÄS	n
Pyruvat	13,08 ±2,75	9	6,35 ±1,78	9	12,97 ±1,56	5	--	-	--	-
Aminosäure	21,82 ±4,94	12	--	-	13,67 ±2,47	12	17,35 ±2,29	6	18,25 ±3,24	7
Arg/NH_4Cl	--		--		15,91 ±2,71	6	--		--	
Fettsäuren	11,21 ±1,19	6	20,97	5	--	-	--	-	--	-

Tabelle 12b

Steigerung der Sauerstoffextraktion (%) nach Pyruvat-, Aminosäuren-, Arg/NH_4Cl- und Fettsäurengabe.

3.1.8. Sauerstoffverbrauch der verschiedenen Perfusionsmedien in Abhängigkeit vom Sauerstoffangebot

Der Sauerstoffverbrauch ließ sich bei den herkömmlichen Medien durch Erhöhung des Sauerstoffangebotes nicht beliebig steigern (siehe Abb. 9). Lediglich bei Fluosol zeigte die Kurve noch keine völlige Sättigungscharakteristik. Ein annähernd maximaler Sauerstoffverbrauch wurde bei den erythrozytenhaltigen Medien schon bei einem Angebot von 8 - 10 ml O_2/(min x 100 g) erreicht.
Wurde den Lebern jedoch ein Substrat zur Umsatzsteigerung angeboten, stieg bei allen Medien der Verbrauch kontinuierlich an, selbst bei einem Sauerstoffangebot von über 20 ml/(min x 100g Leber) ließ sich dann noch eine deutliche Steigerung erzielen (siehe Abb. 8 - 11).
Bei den Versuchen mit diesem extrem hohen Sauerstoffangebot ließen sich Sauerstoffverbrauchswerte von über 9 ml / (min x 100 g Leber) erreichen (bei Fluosol). Bei einzelnen Versuchen wurden sogar Verbrauchswerte von über 13 ml / (min x 100 g Leber) erreicht.

Nach Gabe von Pyruvat ließ sich durch Steigerung des Sauerstoffangebotes eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches erzielen, wobei das Angebot bis auf 20 ml O_2 / (min x 100 g Leber) gesteigert wurde (Abb. 10).

Auch nach Anwendung von Aminosäuren (Abb. 11) sowie Fettsäuren (Abb. 12) kam es zu keiner vollständigen Sättigung des Sauerstoffverbrauches. Es ließ sich dagegen allgemein zeigen, daß sich der Sauerstoffverbrauch der Lebern ohne Substrat ab einem Sauerstoffangebot von 8-10 ml durch Erhöhung des O_2 Angebotes nicht mehr steigern ließ, (außer bei Fluosolperfusion).

Wurde die Stoffwechselleistung der Leber jedoch durch Zusatz von Substraten erhöht, stieg der Sauerstoffverbrauch auch bei sehr hohem Sauerstoffangebot noch weiter an.
Die Sauerstoffextraktion verhielt sich mit und ohne Substratgabe entsprechend dem Sauerstoffverbrauch, wie an den Beispielen in Abb. 12 und 13 zu sehen ist.
Das Niveau der Sauerstoffextraktion bei Fluosolperfusion war auch dann durchwegs höher. So wurde nach Aminosäurengabe bei einem Angebot von 7,63 ml O_2/(min x 100 g Leber) und einem praktisch normalen Sauerstoffverbrauch (6,37 $\pm$ 0,17 ml O_2/(min x 100 g Leber)) noch eine Extraktion von 83,62 $\pm$ 2,44 % erreicht.

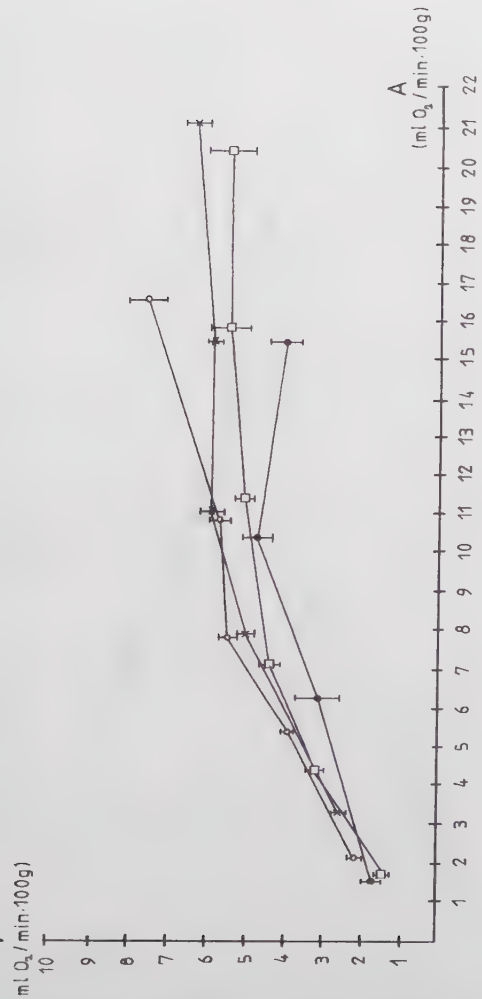

Abb.8:

O_2 Verbrauch in Abhängigkeit vom O_2 Angebot bei verschiedenen Medien ohne Substratangebot. —o— Fluosol —□— Pluronic —×— Schimassek-M. —●— Dextran

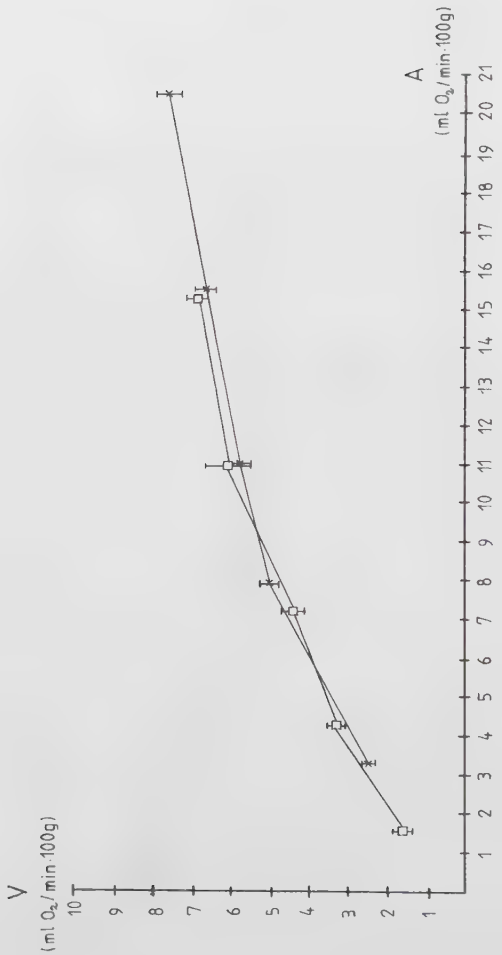

Abb. 9:

O_2 Verbrauch der Rattenleber in Abhängigkeit vom O_2 Angebot nach Gabe von Pyruvat (Anfangskonz. 20 mM/l).

—□— Pluronic —○— Schimassek-M.

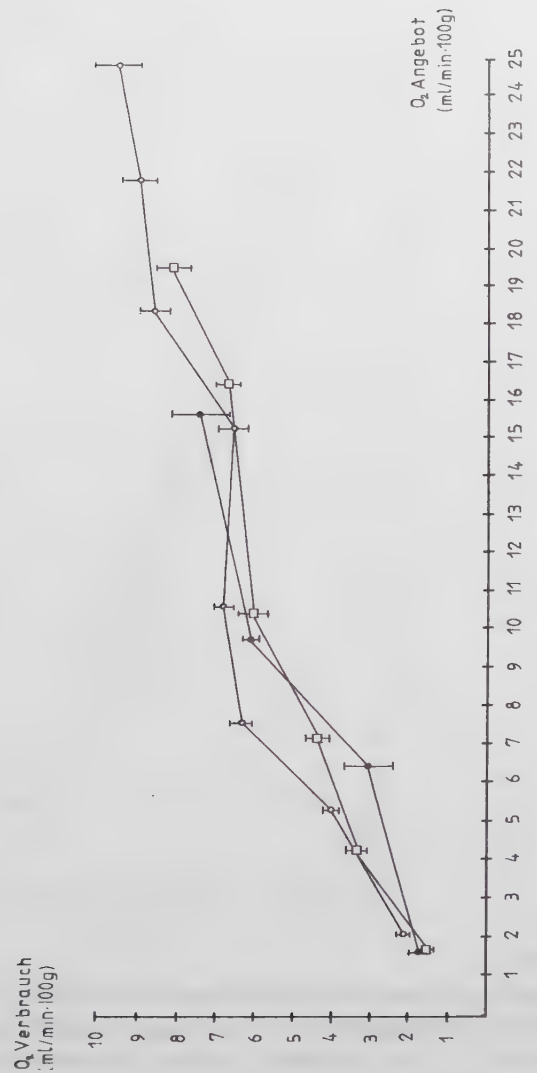

Abb. 10:

O_2 Verbrauch in Abhängigkeit vom O_2 Angebot bei verschiedenen Perfusionsmedien nach Gabe von Aminosäuren (300 mg/dl).

—o— Fluosol —□— Pluronic —•— Dextran

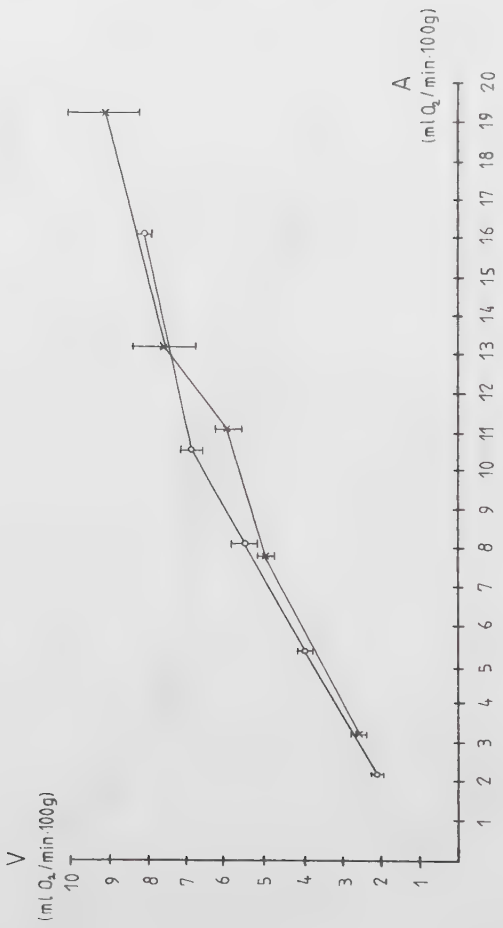

Abb. 11:

O_2 Verbrauch der Rattenleber unter Perfusion mit verschiedenen Medien in Abhängigkeit vom O_2 Angebot nach Gabe von Octanoat (6mM/l). —o— Fluosol —□— Schimassek-M.

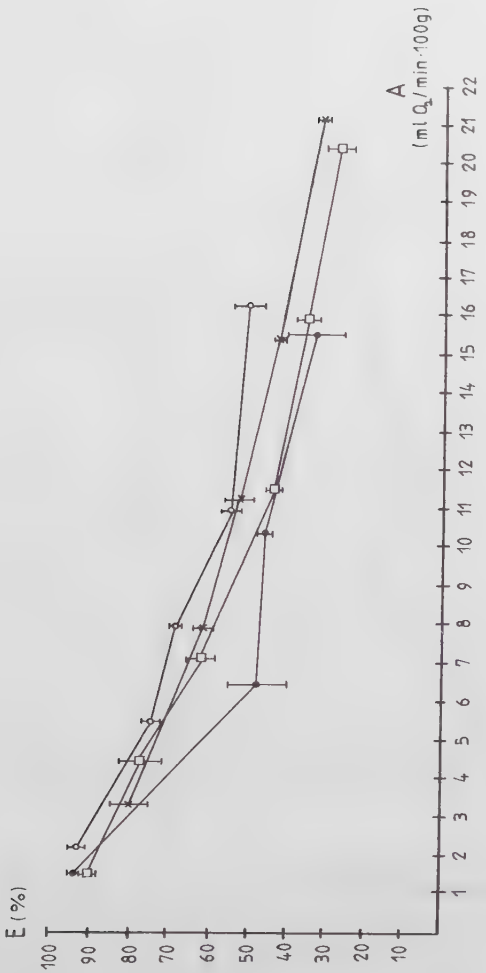

Abb. 12:

O_2 Extraktion in Abhängigkeit vom O_2 Angebot bei verschiedenen Medien ohne Substratangebot. —o— Fluosol —□— Pluronic —×— Schimassek-M. —●— Dextran

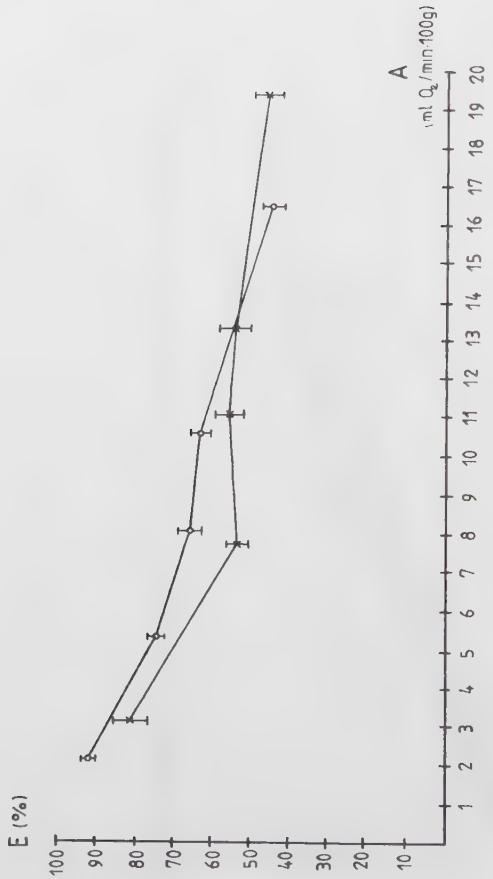

Abb. 13:

O_2 Extraktion in Abhängigkeit vom O_2 Angebot bei verschiedenen Medien nach Gabe von Octanoat (6mM/l).

—o— Fluosol —□— Schimassek-M.

3.2. Glucoseproduktion und Harnstoffproduktion der Perfusionsmedien

Die Leber ist das zentrale Kontrollorgan des Intermediärstoffwechsels.
Desaminierung, Transaminierung, Neubildung von Aminosäuren, Harnstoff- und Harnsäuresynthese sind die Stoffwechselleistungen der Leber im Aminosäuren- und N-Stoffwechsel.
Im Kohlenhydratstoffwechsel hat die Leber durch Speicherung und Mobilisierung von Glykogen, Metabolisierung von Galaktose, Sorbit, Umbau von Glucose und Fruktose in andere Monosaccharide und Unterhaltung des Pentosephosphatzyklus eine zentrale Stellung.
Im Lipidstoffwechsel sind die wichtigsten Aufgaben der Leber Kettenverlängerung bzw. -verkürzung der Nahrungsfettsäuren, Neubildung von Fettsäuren und Cholesterinbiosynthese.
Zur Kontrolle dieser Funktion wurden in unseren Versuchen die Harnstoffproduktion und die Gluconeogenese (z.B. aus Pyruvat) bestimmt.

3.2.1. Glucoseproduktion der Leber nach Gabe von Pyruvat, Aminosäuren und Fettsäuren bei den verschiedenen Perfusionsmedien

Die Glucoseproduktion der weitgehend glykogenfreien Leber (nach 24 h fasten) war bei Pluronicperfusion deutlich niedriger als bei den anderen Medien (Abb.14). Der Unterschied war jedoch, wahrscheinlich wegen der geringen Fallzahl (n=5) nicht signifikant. Durch Gabe von Pyruvat ließ sich bei den Medien außer bei Pluronic die Glucoseproduktion signifikant steigern (P jeweils $\leq$ 0.01). Die höhere Produktion von Glucose bei Fluosolperfusion und Perfusion mit dem Schimassekmedium gegenüber Pluronicperfusion nach Pyruvatgabe (siehe Abb. 15) war signifikant (Fluosol P $\leq$ 0.001, Schimassekmedium P $\leq$ 0.05).

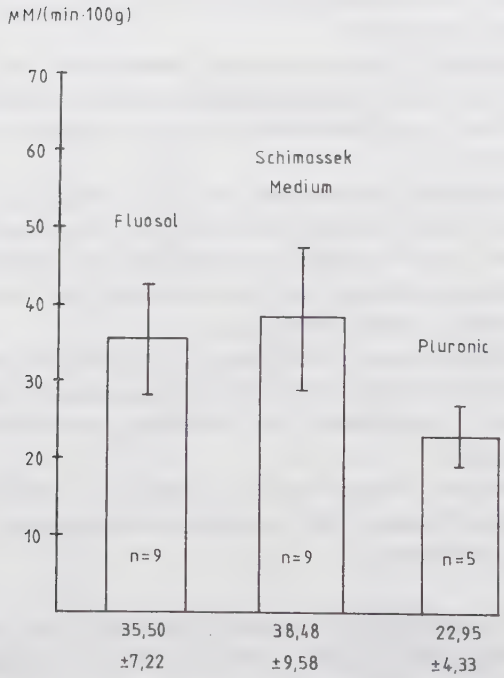

Abb. 14:

Glucoseproduktion bei den verschiedenen Medien ohne Substratgabe

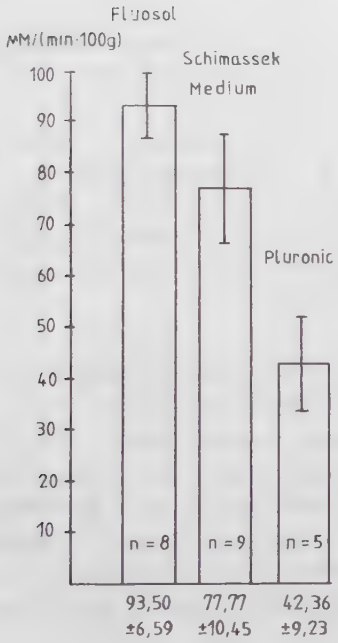

Abb. 15:

Glucoseproduktion in den verschiedenen Medien nach Pyruvatgabe (20 mM/l)

Auch nach Aminosäurengabe ließ sich die Produktion von Glucose signifikant ($P \leq 0.02$) steigern, wie am Beispiel von Fluosol gezeigt werden konnte (siehe S. 48 Abb. 16).
Der Unterschied in der Produktion nach Aminosäuren- und Pyruvatgabe war nicht signifikant.

Die Gabe von Fettsäuren verursachte keine signifikanten Veränderungen in der Glucoseproduktion.

Durch Aminosäuren- oder Pyruvatgabe ließ sich bei allen Medien die Glucoseproduktion über den gesamten Zeitraum von 30 min. steigern.

3.2.2. Steigerung der Glucoseproduktion durch Pyruvatgabe bei den verschiedenen Medien

Bei den Medien wurde jeweils dieselbe Menge Pyruvat (vgl.S.9) zugesetzt. Die resultierende Steigerung der Glucoseproduktion war bei Perfusion mit Fluosol am höchsten (s. Tab . 13) gefolgt von den Lebern, die mit dem Schimassekmedium perfundiert wurden. Statistisch signifikant war jedoch nur der Unterschied zwischen Fluosol- und Pluronicperfusion ($P \leq 0.05$).

	Fluosol	Schimassek-Medium	Pluronic
Δ Glucose-produktion in µMol	58,00 ±12,36	37,04 ±10,08	19,41 ±7,39
n	8	9	5

Tabelle 13:

Steigerung der Glucoseproduktion nach Gabe von Pyruvat (20 mM/l) bei Perfusion mit verschiedenen Medien

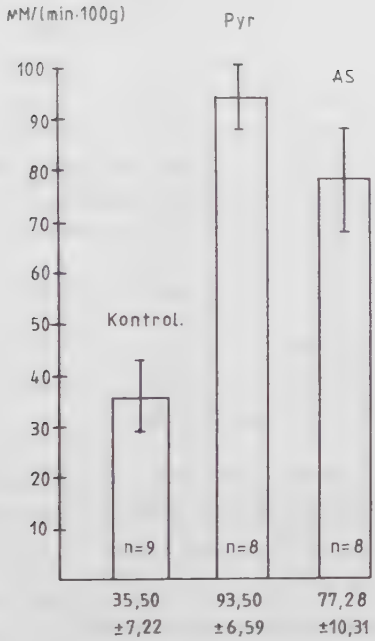

Abb. 16:

Glucose-Produktion bei Fluosol nach AS (300 mg/dl) und nach Pyruvatgabe (20 mM/l)

3.2.3. Harnstoffproduktion der Leber nach Gabe von Aminosäuren, Pyruvat und Fettsäuren bei den verschiedenen Perfusionsmedien

Bei Perfusion der Leber mit dem reinen Medium, d.h. ohne Gabe von Aminosäuren produzierten die Lebern ca. 28 µM/(min x 100 g) Harnstoff, bei Perfusion mit Fluosol war die Produktion jedoch signifikant niedriger (Fluosol/Schimassek M. $P \leq 0.05$, Fluosol/Pluronic $P \leq 0.02$), wie in Tabelle 14 gezeigt wird. Das ist durch den unterschiedlichen Gehalt an N-haltigem Substrat erklärbar.

	Fluosol (praktisch N-frei)	Schimassek Medium	Pluronic
Harnstoff-produktion µM/(min x100g)	14,33 ±4,68	27,99 ±3,43	27,40 ±3,97
n	11	8	16

Tabelle 14:
Harnstoffproduktion der verschiedenen Medien ohne Substratgabe, Sauerstoffverbrauch und Angebot siehe Kapitel 3.1.1.

Nach Gabe von 300 mg/dl Aminosäuren zu dem jeweiligen Perfusat ließ sich die Harnstoffproduktion bei den mit Fluosol perfundierten Lebern so erhöhen, daß sie signifikant über denen mit Pluronicperfusion lag ($P \leq 0.001$).

Nach Aminosäurengabe erreichte der Anstieg der Harnstoffproduktion in der 10 - 20 min. Periode einen Höhepunkt und fiel in der Zeit zwischen 20 und 30 min. wieder ab. Bei NH_4Cl/Arginin-Gabe fiel die Harnstoffproduktion nach dem sofortigen Anstieg (0-10 min. Periode) wieder kontinuierlich ab. Die Steigerung der Harnstoffproduktion war hier ebenfalls signifikant ($P \leq 0.05$).

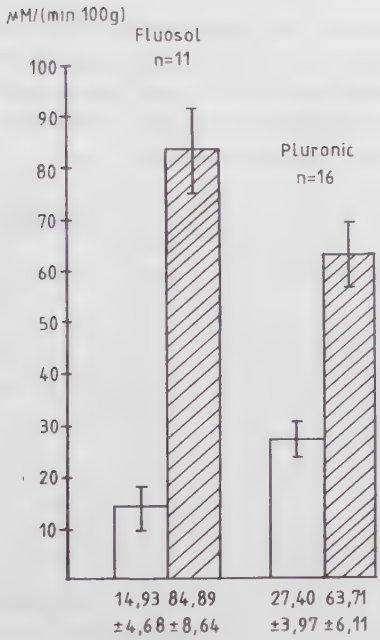

Abb. 17:

Harnstoffproduktion vor und nach Gabe von AS bei Fluosol- und Pluronicperfusion

☐ ohne Substrat ▨ nach AS

(Sauerstoffverbrauch und Angebot sh. Kap. 3.1.4 und 3.1.6)

3.2.4. Steigerung der Harnstoffproduktion nach Aminosäurengabe bei verschiedenen Medien

Dem Pluronicmedium und Fluosol wurden die selbe Menge Aminosäuren zugesetzt. Die daraus resultierende Steigerung der Harnstoffproduktion war jedoch bei Fluosol fast doppelt so hoch (siehe Tabelle 16). Der Unterschied war signifikant ($P \leq 0.01$).

	Fluosol	Pluronic
Δ Glucose-produktion (µM/(minx100g)	69,96 ±7,42	36,31 ±7,61

3.2.5. Das Verhältnis von Sauerstoffmehrverbrauch zur Produktion von Glucose und Harnstoff

Die pro µmol Sauerstoffmehrverbrauch produzierte Glucose (in µmol) nach Pyruvatgabe war je nach Perfusionsmedium unterschiedlich (siehe Tabelle 16), am höchsten bei Fluosol, gefolgt vom Schimassek-Medium und Pluronic.
Signifikant war jedoch nur der Unterschied zwischen Fluosol und Pluronic ($P \leq 0.05$).

Medium	Fluosol	Pluronic	Schimassek-Medium
$\Delta O_2/\Delta$ Glucose-prod.	0,85 ±0,23	3,27 ±1,34	2,36 ±0,76
n	7	5	9
$\Delta O_2/\Delta$ Harnstoff-prod.	1,09 ±0,12	2,77 ±0,60	--
n	11	15	

Tabelle 16:
$\Delta O_2/\Delta$ Glucoseproduktion nach Pyruvatgabe und $\Delta O_2/\Delta$ Harnstoffproduktion nach Aminosäurengabe

Ein ähnliches Bild ergab sich bei dem Verhältnis $\Delta O_2/\Delta$ Harnstoffproduktion. Bei Fluosolperfusion wird pro µmol Sauerstoffmehrverbrauch nach Aminosäurengabe die Harnstoffproduktion am meisten gesteigert. Der Unterschied zu Pluronic ist signifikant ($P \leq 0.05$). Nach Aminosäurengabe wurden ungefähr äquimolare Mengen von Harnstoff und Glucose mehr produziert.

IV. D I S K U S S I O N

4.1. Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffextraktion

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Absolutwerte für den Sauerstoffverbrauch der Leber, bei isolierter Perfusion des Organs angegeben, die Werte schwanken zwischen 1,18 und 6,7 ml O_2/(min. x 100 g) (siehe Tabelle 17).
Bei Leberperfusionen mit Fluorcarbonlösungen werden Sauerstoffverbrauchswerte von 1,63 - 4,0 ml/(min x 100g Lebergewicht) beschrieben, (Triner 1970, Brown 1972).
Bei Fluosol-DA-Perfusion der Leber ließ sich bei uns ein höherer Sauerstoffverbrauch erreichen (vgl. Kap. 3.1) als bisher häufig für PFC Lösungen beschrieben.
Hämoglobinfrei perfundierte Lebern erfordern eine Perfusionsstärke von 500 - 700 ml/(min x 100 g) und führen zu einem Ansteigen des Gewichtes auf 170 - 180 %, (Scholz 1967), ein Sauerstoffverbrauch von 4,16 - 6,2 ml O_2/(minx100g) (Thurman und Scholz, 1969, Debeer et al. 1974) konnte hier jedoch erreicht werden, wenn auch oft von wesentlich niedrigeren Werten berichtet wird (1,05 von Carlson und Lefer 1976, 2,46 von Schmucker et al, 1975).
Im Gegensatz dazu ist der Wassergehalt der mit Fluosol perfundierten Lebern wie von uns schon früher beschrieben (Lutz et al. 1978b) nicht höher als bei mit erythrozytenhaltigen Medien (z.B. Pluronic) perfundierten Lebern.

Die von uns erreichten Werte für den Sauerstoffverbrauch bei Perfusion mit Dextran-, HÄS-, Pluronic- und Schimassek-Medium entsprechen den bisher in der Literatur erwähnten.

Mit Fluosol-DA gelingt es also, die Leber ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, um die Funktion des Organs über die Versuchsdauer von 3-4 Stunden so aufrechtzuerhalten, daß der Sauerstoffverbrauch signifikant höher als bei den meisten erythrozytenhaltigen Medien ist. Da in der Leber im Vergleich zu anderen Perfusionslösungen ein relativ hoher Prozentsatz an Fluorcarbonen gespeichert wird (Yokoyama et al. 1977, 1978) ist es möglich, daß ein Teil des hohen Sauerstoffverbrauches durch eine Begünstigung der oxidativen Metabolisierung bedingt ist.

Bei Fluosolperfusion und Perfusion mit Schimassekmedium wurden Sauerstoffverbrauchswerte nach Fettsäuren- u. Aminosäurengabe von durchschnittlich 8 - 9 ml/(min x 100 g Leber) erreicht. Bei einzelnen Versuchen ließ sich der Verbrauch auf über 13 ml/(min x 100 g Leber) steigern. Dies entspricht den in der Literatur angegebenen Spitzenwerten (Debeer et al. 1974).

Tabelle 17:

Literaturangaben zum Sauerstoffverbrauch der isoliert perfundierten Leber. Mit + gekennzeichnete Werte wurden aus Originalangaben berechnet.

Autor	Jahr	Spezies	Medium	O_2 Verbrauch (ml/minx100g Leber)
Schimassek	1962	Ratte	nach Schmiassek	5,15 +
Hems et al.	1966	Ratte	wie Schimassek Medium jedoch menschl.Erys	4,93 +
Scholz et al.	1966	Ratte	Hb-frei	3,92+ 5,6+ nach Alanin
Grunst	1967	Ratte	Dextranlösung	4,30 +
Bombeck et al.	1968	Rind	Eigenblut	2-3,5
Thurman u. Scholz	1969	Ratte	Krebs Henseleit +Rinderalb	4,16 +
Triner et al.	1970	Ratte	Fluosol/FX 80	1,63 +
Scholtholt	1970	Hund	Eigenblut	1,99 $\pm$ 0,15 nach AS 3,38
Brown, Hardison	1972	Ratte	Fluorcarbon (FX 80)	ca. 4,2
Reerink	1972	Ratte	Schaferys u.Rinderalb.	5,24 +
Debeer et al.	1974	Ratte	Rinderalb.u.Krebs Henseleit Lösung	6,2 + nach FS 9,05 +
Bakker et al.	1976	Ratte	nach Schimassek	6,7
Lutz et al.	1975	Katze	Eigenblut	6,08
Ohyanagi, Mitsumo	1975	Ratte	Perfluorcarbon-Lösung aus FX80, FC43, FMD, FDC, Freon E4	2,0
Müllhofer et al.	1976	Ratte	Krebs-Henseleit	4,09 + nach Pyr./6,25
Thurmann, Scholz	1977	Ratte	Krebs-Henseleit	4,33 +
Andreen u. Irestedt	1976	Hund	Eigenblut	1,18 +
Yuku u. Thurmann	1980	Ratte	Henseleit	3,99 nach Äthanol 7,17

Bei allen Medien ließ sich durch Gabe der Substrate Pyruvat, Aminosäuren, NH_4Cl/Arginin und Fettsäuren der Sauerstoffverbrauch signifikant steigern, wie schon Hems et al. 1966 für NH_4Cl, Debeer et al. 1974 für Octanoat und andere für Aminosäuren (Häussinger, Sies 1979; Ayuso, Parrila 1977) zeigen konnten.
Wie Tabelle 8 zeigt ließ sich durch Fettsäurengabe die höchste Steigerung des Sauerstoffverbrauchs erreichen.
Die einzelnen Medien zeigen zwar keine signifikanten Unterschiede in der Steigerung des Sauerstoffverbrauchs bei Gabe des selben Substrates, das Verhältnis $\Delta O_2 / \Delta$ Substratproduktion ist jedoch deutlich vom Perfusionsmedium abhängig (vgl. Kapitel 4.2. und 3.2.5).
Der Sauerstoffverbrauch der Leber läßt sich durch Erhöhung des Sauerstoffangebotes zunächst steigern, ab einem Angebot von etwa 8-11 ml O_2/(min x 100 g Leber) ist ein weiterer Anstieg in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lutz et al. 1975 aber sehr gering (siehe Abb. 9). Lediglich bei Fluosol steigt der Verbrauch noch etwas weiter an. Die Verbrauchskurven von Fluosol und dem Schimassek-Medium liegen dabei höher als die der anderen Medien. Es läßt sich jedoch zeigen, daß nach Substratgabe die Sauerstoffverbrauchskurven auch über diese Grenze weiter ansteigen, selbst bei einem Angebot von 25 ml/(min x 100 g Leber) zeigen die Kurven noch steigende Tendenz (Abb. 10-12). Wegen des unphysiologischen portalen Druckes wurde das Angebot darüberhinaus nicht erhöht.
Aus der hohen Sauerstoffextraktion kann auf eine gleichmäßige Verteilung des Perfusats auf die kurzen und langen Sinusoide geschlossen werden (Lutz 1977). Im Gegensatz dazu beschreiben Brown und Hardison (1972) eine ungleichmäßige Verteilung in den Sinusoiden und einen Anstieg des Perfusionsdruckes durch Blockade von Sinusoiden bei Versuchen mit Perfluorbutyltetrahydrofuran. Bei diesem Medium liegt die Partikelgröße jedoch bei 5 µm, der onkotische Druck lag bei 6.8 KPa(= 51mm Hg) und die Freisetzung von Fluoridionen erscheint wahrscheinlich.

Dadurch bedingte hohe Embolienraten und Toxizität (Clark et al. 1976) sind wahrscheinlich auch die Ursache für die schlechteren Ergebnisse bei Brown und Triner mit ihrer Fluorcarbonemulsion (Werte von Fluosol DA 2.1,3).
Die Sauerstoffextraktion bei Fluosolperfusion erreichte bei uns Werte, die bisher nur bei Hypoxie beschrieben wurden (Lutz et al. 1975, Larsen et al. 1976, Bakker et al. 1977). Es zeigt sich somit, daß die Leber in der Lage ist, erhöhten Sauerstoffbedarf durch Erhöhung der Sauerstoffextraktion zu decken (vgl. Abb. 3). Bei Erhöhung des O_2-Angebotes auf 8-11 ml/(min x 100 g) fiel die Sauerstoffextraktion bei allen Medien wegen der fehlenden Steigerung des O_2 Verbrauches ab. Durch Substratgabe konnte die Extraktion jedoch wegen der weiteren Steigerung des Sauerstoffverbrauches auf einem höheren Niveau gehalten werden.
Eine Sauerstoffextraktion von 90% bei normalen O_2 Angebot und Substratgabe wurde außer bei Fluosolperfusion noch nicht beschrieben (Lutz 1975, Lutz et al. 1978a). Ursachen dieser extremen Sauerstoffextraktion bei Fluosol sind wahrscheinlich die geringen intravaskulären Diffusionsstrecken und die große Oberfläche der Sauerstoffträger (Naito u. Yokohama 1975). Die Sauerstoffextraktion verhielt sich bei den Medien entsprechend dem Sauerstoffverbrauch (Extraktion bei Normoxie 30 - 40 %), bei Fluosol wurde aufgrund des hohen Verbrauches schon bei Normoxie Werte von 70 % - 80 % erreicht (siehe Abb. 2 und 11), wie schon beschrieben (Lutz, Jacobs u. Decke 1978a). Bei Hypoxie steigt die Sauerstoffextraktion auf Werte über 90 % an. Dies stimmt mit den von Lutz, Henrich und Bauereisen (1975) angegebenen Werten überein. Dies ist sicher Ausdruck des schon von Lutz et al. (1975) beschriebenen Mechanismus der Leber, vermindertes O_2 Angebot durch höhere Extraktionen auszugleichen, da eine wesentliche Vasodilatation im Leberstromgebiet als Regulation nicht existiert (Green et al. 1959, Torrance 1961, Scholtholt 1970).
Der erhöhte O_2 Verbrauch zusammen mit einer erhöhten O_2 Extraktion bei Gabe von Substraten des Lebermetabolismus (Tab.8-11) besonders bei Fluosol als Perfusionsmedium zeigt, daß die

Hepatozyten einerseits am Ende der langen Sinusoide trotz hohem Umsatzes noch genügend Sauerstoff angeboten bekommen, andererseits am Ende der kurzen Sinusoide dennoch einen bereits erheblichen Teil des angebotenen Sauerstoffs extrahiert haben.

4.2. Stoffwechsel

Als Parameter im Vergleich der verschiedenen Perfusionsmedien diente uns hier nicht nur der Sauerstoffverbrauch sondern auch Glucose- und Harnstoffproduktion der Leber.

4.2.1. Gluconeogenese in Abhängigkeit von verschiedenen Substraten und Perfusionsmedien

Gluconeogenese ist definiert als Synthese von Glucose aus Nichtkohlenhydraten z.B. aus Lactat, Pyruvat, glucoplastischen Aminosäuren bzw. deren Abbauprodukten (s.Abb.22). Zur Bestimmung der Gluconeogenese der isolierten Leber sollte diese weitgehend glykogenfrei sein, um den Einfluß des Glykogenabbaues während der Perfusion (Schimassek 1963) auszuschalten.

Um dies zu erreichen mußten die Tiere vor dem Versuch 24 Stunden fasten, die Leber ist dann weigehend glykogenfrei (Debeer et al. 1974). Die Regulation der Gluconeogenese durch Glucagon, Katecholamine, Insulin (direkte Beeinflussung über den Substratspiegel) entfällt bei unseren Versuchen durch die isolierte Perfusion.
Für die Glucoseproduktion der glykogenfreien Rattenlebern in vivo werden Werte zwischen 50 und 140 µ mol/(min x 100g) angegeben (siehe Tabelle 18). Bei Leberschnitten werden wesentlich niedrigere Werte gefunden (siehe Tabelle 18). Für die Glucoseproduktion von perfundierten Lebern werden bei erythrozytenhaltigen Albuminlösungen Werte von 11-30 µ mol/(min x 100g) beschrieben (siehe Tabelle 18), bei hämoglobinfreier Perfusion liegen die Werte niedriger.

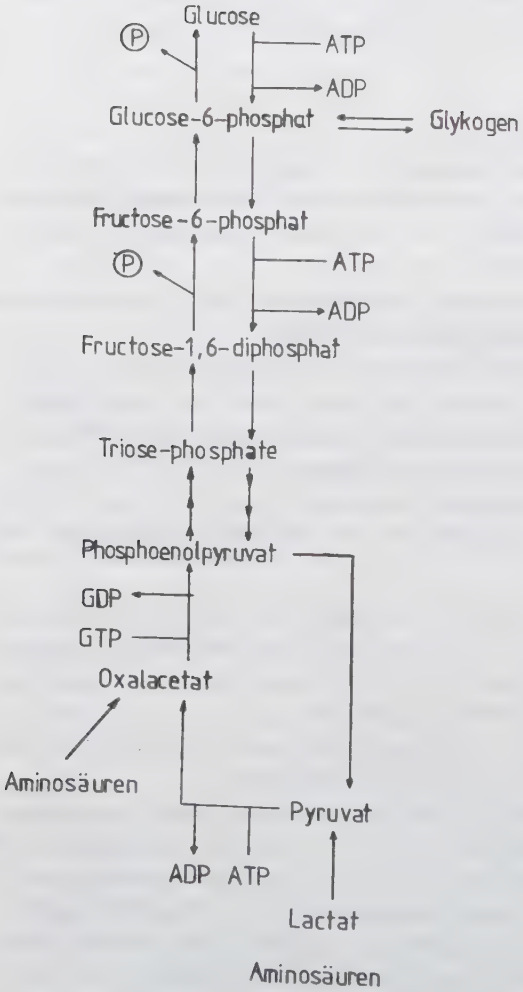

Abb. 19:

Gluconeogenese

Tabelle 18:

Übersicht über die Glucoseproduktion bei verschiedenen Autoren

System	Perfusionsmedium	Substrat	Glucose-produkt. (µM/(minx100g)	Autor
in vivo	--	--	140	Ashmore et al.1964
in vivo	--	Lactat	50	Hornbrook et al.1965
Schnitte	--	Pyruvat	18	Ashmore t al.1964
perfundierte Leber	Krebs-Henseleit Lösung +Rinderalb.+Humanerys	-- Lactat	14 105	Hems et al.1966
perfundierte Leber	Hämoglobinfreies Medium	-- Alanin	0 26,7	Scholz et al.1966
perfundierte Leber	Krebs-Henseleit Lösung +Rinderalb.+Rattenerys	--	30	Exton et al.1966
perfundierte Leber	Krebs-Henseleit Lösung +Rinderalb.+Humanerys	Alanin	66	Ross et al.1967
perfundierte Leber	Perfluorocarbon FX 80	Alanin	12,7	Triner et al.1970
perfundierte Leber	Krebs-Henseleit Lösung +Rinderalb.	-- Octanoat	8,3 2,2	Debeer 1974
perfundierte Leber	Krebs-Henseleit Lösung +Rinderalb.+Humanerys	-- Cystein	11-35 21-51	Simpson et al.1975
perfundierte Leber	Krebs-Henseleit Lösung	-- Pyruvat	7,17 58,8	Müllhöfer et al.1976
perfundierte Leber	Krebs-Henseleit Lösung +Albumin	-- L-Alanin	20 111,7	Ayuso-Parrila
perfundierte Leber	Rattenblut	-- Äthanol	16,2 50,00	Topping et al.
perfundierte Leber	Fluosol DA	-- Pyruvat	35,5 93,5	vorliegende Arbeit

Bei Perfusion mit Perfluorcarbon wird von Triner ca. 13 µM/(minx100g) angegeben. Die von uns erreichten Werte liegen sowohl bei Pluronicperfusion mit 30 µM/(minx100g) als auch bei Perfusion mit dem Schimassek-Medium mit 38,5 µM/(minx100g) im oberen Bereich.
Bei Fluosolperfusion werden wesentlich höhere Werte erreicht. Nach Pyruvatgabe steigt bei Fluosolperfusion die Glucoseproduktion auf 93,5 µM/(minx100g) und ist somit höher als bei den anderen Perfusionsmedien (s.S.46). In der Literatur werden in Krebs-Henseleit Lösung unter Pyruvat Werte von 58,8 µM/(minx100g) beschrieben (Müllhofer 1976).
Aus den glucoplastischen Aminosäuren der Aminosäurenlösung wird die Gluconeogenese bei Fluosolperfusion (s.S.48) ähnlich stark angeregt (77,3 µM/(minx100g))und entspricht den in der Literatur angegebenen Werten für Perfusion mit erythrozytenhaltigen Medien.
Durch Fettsäurengabe wird bei uns in Übereinstimmung mit Debeer (1974) kein Anstieg der Gluconeogenese erreicht.

4.2.2. Harnstoffproduktion der isoliert perfundierten Leber

Das Endprodukt des Aminosäuren- und Proteinstoffwechsels beim Säugetier ist der Harnstoff. In einem endergonischen Prozess wird über den Krebs-Henseleit Zyklus aus zwei NH_3 Molekülen eine Molekül Harnstoff gebildet.
Die Harnstoffsynthese ist also von der Intaktheit des energieliefernden Systems abhängig.
Für die Harnstoffproduktion der isoliert perfundierten Leber werden in Abhängigkeit vom Perfusionsmedium Werte von 9 - 22,6 µM/(minx100g) angegeben (s. Tabelle 19), nach Gabe einzelner Aminosäuren zum Perfusat schwanken die angegebenen Werte zwischen 26,7 und 42 µM/(minx100g) nach Gabe von NH_4Cl werden Werte bis zu 110 µM/(minx100g) beschrieben. Novakova et al. (1976) erreichten bei Perfusion mit einer aminosäurenhaltigen Perfluorcarbonlösung eine Produktion von 10,1 - 19,3 µM/(minx100g).

Die von uns (s.S.49) bei substratfreien Medien beschriebenen Werte in Höhe von 14,33-27,99 µM/(minx100g) stimmen mit den entsprechenden Größen überein. Bei Perfusion mit dem Fluosol DA-Medium mit Aminosäuren als Substrat erreichen wir wesentlich höhere Werte als Novakova (1975) mit Perfluorcarbon-Lösung (84,9 µM/(minx100g) gegenüber 19,3 µM/(minx100g). Da die Aminosäurenmenge bei Novakova nicht angegeben wurde, ist ein Vergleich jedoch nur bedingt möglich. Die nach Aminosäurengabe produzierten Glucose- und Harnstoffmengen sind ungefähr äquimolar. Die bei Fluosol DA gegenüber den anderen Medien signifikant niedrigere Harnstoffproduktion ohne Substratgabe ist sicher auf das Fehlen jeglicher Ausgangssubstanzen, die zu Harnstoff abgebaut werden, zurückzuführen. Dagegen zeigte sich, daß nach Gabe von Aminosäuren als Substrat die Harnstoffproduktion bei Fluosolperfusion signifikant höher ist als bei Pluronicperfusion (vgl. Kap.3.2.3.).

Medium	Substrat	Harnstoffprod. (µM/minx100g Leber)	Autor
Krebs-Henseleit Lösung +2,5 % Albumin	--	10,2	Scholz 1967
Fluosol 43	Aminosäuren	10,1 - 19,3	Novakova et al.1976
Krebs-Henseleit	NH_4Cl	110	Häussinger et al.1975
Krebs-Henseleit	--	20	Chamalaun und Tager
Lösung +Albumin	Alanin	34	
+Humanerys	Glutamin	42	
	NH_4Cl	90	
Hb-frei	Arginin	26,7	Scholz et al. 1966
Krebs-Henseleit + Albumin	--	22,6	Debeer et al. 1974
Krebs-Henseleit	--	9	Hems et al. 1966
Lösung+Albumin	NH_4Cl	80	
+Humanerys	NH_4Cl/ Ornithin	187	
Krebs-Henseleit Lösung+Albumin +Schaferys	--	18	Reerink 1972

Tabelle 19: Übersicht über die Harnstoffproduktion isolierter perfundierter Lebern bei verschiedenen Autoren

Die pro µMol Harnstoffmehrproduktion benötigte Sauerstoffmengen (in µM) war bei Perfusion der Leber mit Fluosol geringer als bei Pluronicperfusion, ebenso die Sauerstoffmenge, die zur Glucoseproduktion aus Pyruvat benötigt wurde.
Gegenüber Perfusion mit dem Schimassek-Medium ergaben sich jedoch bei Fluosolperfusion keine signifikant besseren Werte. Es zeigt sich auch hier, daß der Metabolismus der Leber bei Fluosolperfusion zumindest so gut erhalten ist, wie bei Perfusion mit erythrozytenhaltigen Medien.

4.3. Perfusionsmedien

Die verwendeten Perfusionsmedien unterschieden sich zum einen durch die verwendeten Plasmaexpander und zum anderen durch die Sauerstoffträger. Bei Fluosol wird ein ausreichender Sauerstofftransport durch die sehr hohe Löslichkeit von CO_2 und O_2 in den Perfluorcarbonpartikeln erreicht (in der Reinsubstanz bis zu 58 ml/dl, vgl. Geyer 1975), bei den anderen Medien durch Erythrozyten mit Hämoglobin als Sauerstoffträger, sowie einem nur geringen Anteil an physikalischer O_2-Lösung.
Dextran, Albumin und Hydroxyäthylstärke als Plasmaersatzmittel sind für ihre onkotische Wirkung hinreichend bekannt, Pluroniclösungen wurden erstmals als Pluronic F 68 von Hymes et al. 1968 mit guten Ergebnissen als Plasmaersatzmittel verwendet. Vom Pluronic F 108 berichten Franke et al. (1975) von guten Ergebnissen bei Perfusion isolierter Nieren im Vergleich mit anderen Plasmaersatzmitteln.
Das verwendete Perfluorcarbon wurde entwickelt, um die nachteiligen Wirkungen früherer PFC-Lösungen (Gasembolien z.B. bei FC 75, lange Verweildauer z.B. bei Fluosol 43) zu vermeiden. Es zeigt sich bei unseren Versuchen, daß Sauerstoffverbrauch, Sauerstoffextraktion, Gluconeogenese und Harnstoffproduktion bei Perfusion mit Fluosol DA höher sind als bei den meisten anderen Medien.

Dabei unterscheidet sich die PFC Emulsion von den anderen Medien in vielen Punkten. So haben die PFC-Partikel eine wesentlich geringere Größe als Erythrozyten und besitzen damit günstigere Bedingungen für die Sauerstoffdiffusion. Bei einem Vergleich mit den anderen Medien kann eingewendet werden, daß Rindererythrozyten zu einer ungleichen Verteilung des Blutstromes geführt haben könnten.
Dagegen sprechen allerdings die guten Ergebnisse beim oxidativen Metabolismus der mit erythrozytenhaltigen Medien perfundierten Lebern. Deren Werte sind durchaus vergleichbar mit denen, die bei Lebern größerer Spezies bei Eigenblutperfusion erreicht wurden (vgl. Tab. 17). Ein weiterer Aspekt ist der Vergleich der Sauerstoffdissoziation zwischen Fluosol und hämoglobinhaltigen Perfusaten. Der O_2 Bindungskurve des Blutes steht die lineare Verlaufskurve des physikalisch gelösten Sauerstoffs in der PFC Emulsion gegenüber. Daraus folgt, daß in Fluosol ein höherer venöser pO_2 als in den Vergleichsmedien bei gleichem O_2 Verbrauch und Angebot zu erwarten ist, wie von uns auch schon beschrieben (Lutz et al. 1978). Um diesen Effekt zu erreichen muß der arterielle pO_2 bei Fluosol natürlich wesentlich höher sein als bei den Vergleichsmedien. Der venöse pO_2 lag bei Fluosol zwischen 100 und 200 mm/Hg,bei den anderen Medien zwischen 30 und 60 mm/Hg (Ischämie jeweils ausgenommen). Ob der durch PFC Partikel bedingte Anstieg der intracellulären Sauerstoffkonzentration oder der lokal erhöhte Löslichkeitskoeffizient als Ursache für den vermehrten Sauerstoffverbrauch in Frage kommt,müßte erst durch weitere Untersuchungen vor allem der intracellulären O_2-Gradienten geklärt werden. Trotz der guten Ergebnisse bei Fluosol DA-Perfusion der Leber spricht gegen die Anwendung in sehr großen Mengen die starke Speicherung in den Organen des reticulo-endothelialen Systems (Leber, Milz,Knochenmark),wie von Lutz (1980) beschrieben.

V. Zusammenfassung

Der Einfluß verschiedener Perfusionsmedien auf den oxidativen Metabolismus der Leber wurde an isoliert perfundierten Rattenlebern untersucht. Die perfluorcarbonhaltige Emulsion Fluosol DA sowie erythrozytenhaltige Lösungen mit Dextran, HÄS, Pluronic F 108 oder Albumin als kolloidale Lösungen wurden zur Perfusion verwendet. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Der Sauerstoffverbrauch bei Fluosolperfusion ohne Substratgabe war mit 6,88 ml/(min x 100 g Leber) signifikant höher als bei allen anderen Medien außer dem Albumin-Medium. Bei Pluronicperfusion konnte ein signifikant höherer Verbrauch als bei Perfusion mit HÄS oder Dextran erreicht werden. Nach Substratgabe stieg bei Fluosol der Sauerstoffverbrauch bis auf 8,66 ml/(min x 100 g Leber).
Bei Substratgabe oder PFC-Perfusion zeigte der O_2-Verbrauch in Abhängigkeit vom O_2-Angebot im Gegensatz zur substratfreien Perfusion eine wesentlich geringere Sättigungscharakteristik. Bei substratfreier Perfusion konnte der Sauerstoffverbrauch durch eine Erhöhung des Sauerstoffangebots über 8 - 11 ml/(min x 100 g Leber) nicht erhöht werden. Nach Substratgabe ließ sich dagegen bei Erhöhung des O_2-Angebotes bis auf 24 ml/(min x 100 g Leber) der Sauerstoffverbrauch noch steigern. Die höchste Steigerung des Sauerstoffverbrauches wurde mit Fettsäuren als Substrat erreicht, gefolgt von Aminosäuren und Pyruvat. Der hohe O_2 Verbrauch bei Fluosol wird zum Teil durch erleichterte Diffusion erklärt.

Sauerstoffextraktionen von 80-90 % bei Normoxie nach Substratgabe bei Fluosolperfusion wurden erreicht. Eine extrem hohe Sauerstoffextraktion kann bei der Leber folglich nicht nur durch Hypoxie sondern auch durch Erhöhung des O_2-Bedarfs erreicht werden. Die hohen Extraktionsraten sind wahrscheinlich auf die vergrößerte Oberfläche der O_2 transportierenden emulgierten PFC Partikel und geringe Diffusionsstrecken zurückzuführen.

Die Gluconeogeneserate und Höhe der Harnstoffproduktion wurden bestimmt. Sie stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. Die bei Fluosol DA gemessenen Produktionsraten waren höher als die in der Literatur angegebenen für andere Perfluorcarbonlösungen. Fettsäuren erhöhten bei keinem Medium die Gluconeogenese.

Die pro M O_2 Mehrverbrauch produzierte Glucose- und Harnstoffmengen sind bei PFC-Perfusion signifikant höher als bei Pluronicperfusion. Der Unterschied zum Schimassek-Medium war nicht signifikant.

Die guten Ergebnisse im Sauerstoffverbrauch und Metabolismus der Rattenleber bei Perfusion mit Fluosol DA lassen auf eine ausgezeichnete Funktion der Leber schließen. Dieses Perfusionsmedium erscheint somit gut geeignet für Untersuchungen isolierter Organe. Wenn auch einige Ergebnisse noch nicht sicher erklärbar sind und weiterer Untersuchungen bedürfen, so ist mit Fluosol DA doch ein besserer Erythrozytenersatz als mit den bisher entwickelten Perfluorcarbonlösungen vorhanden.

Literaturverzeichnis

Andreen M., Irestedt L.: Decrease of oxygen consumption in the dog liver during temporary arterial occlusion. Acta physiol. scand 98, 103, (1976)

Ayuso-Parilla, M.S., Martin-Requero, A., Parrila R.: On the mechanism of glucagon stimulation of hepatic gluconeogenesis. Pflügers Arch. 370, 45, (1977)

Ashmore, J., Wagle, S.R., Uete, T.: Studies on gluconeogenesis. Adv. Enzyme Regul. 2: 101 (1964)

Bakker, J.C., Gortmaker, G.C., Vrolijk, A.C.M. Offerijns,F.G.J.: The influence of the position of the oxygen dissociation curve on oxygen-dependent functions of the isolated perfused rat liver. I. Studies at different levels of hypoxic hypoxia. Pflügers Arch. 362, 21, (1976)

Bakker, J.C., Gortmaker, G.C., De Vries-van Rossen, A., Offerijns F.G.J.: The influence of the position of the oxygen dissociation curve on oxygen-dependentfunctions of the isolated perfused rat liver. III. Studies at different levels of anaemic hypoxia. Pflügers Arch. 368, 63,(1977)

Bernard, C.: Sur le mèchanisme de la formation du sucre dans le foie. Comptes Rendu des Sèances de l'Acadèmie des Sciences, 41, 461, (1855)

Bombeck, C.T., Brava, C., Condou, R.E. Nyhus, L.M.: Parameters of normal liver funktion in the isolated perfused bovine liver. In: Organ perfusion and preservation,Ed.: Norman, J.C., New York ,Appleton-Century-Crofts 1968 p . 573

Brauer, R.W., Pessotti, R.L., Pizzolato, P.: Isolated rat liver preparation. Bile production and other basic properties. Proc. Society Experimental Biol. and Med. 78, 174 (1951)

Brodie, T.G.: The perfusion of surviving organs. J. physiol. 29, 266 (1903)

Brown, H., Hardison, W.G.M.: Fluorocarbon sonicated as a substitute for erythrocytes in rat liver perfusion. Surgery 71, 388 (1972)

Chamalaun, A.F.M., Tager, J.M.: Nitrogen metabolism in the perfused rat liver, Acta biochemica et biophysica 222, 119, (1970)

Carlson, R.P., Lefer, A.M.: Hepatic cell integrity in hypodynamic states Am.J. Physiol. 231, 1408, (1976)

Clark, L.C.: Whole animal perfusion with fluorocarbon dispersions. Fed. Proc. 29, 1695, (1970)

Clark, L.C., Wesseler, E.P-, Kaplan S., Miller, M.L. Becker, D., Emory, C., Stanley, L., Becattini, F., Obrak, V.: Emulsions of perfluorinated solvents for intravascular gas transport. Fed.Proc. 34, 1468, (1975)

Corey, E.L., Britton, S.W.: Glycogen levels in the isolated liver perfused with cortico-adrenal extract, insulin and other preperations. Amer.J.Physiol. 131, 783 (1941)

Debeer, L.J., Mannaerts, G., De Schepper, P-J.: Effect of octanoate and oleate on energy metabolism in the perfused rat liver. Eur.J.Biochem. 47, 592, (1974)

Exton, J.H., Jefferson, L.S., Butcher, R.W., Park, C.R.: Gluconeogenesis in the perfused liver. The effects of fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinephrine, adenosine 3', 5' monophosphate and Insulin. Am.J.Med. 40, 709, (1966)

Franke, H., Sobotta, E.E., Witzki, G., Unsicher, K.: Funktion und Morphologie der isolierten Rattenniere nach zellfreier Perfusion mit verschiedenen Plasmaexpandern. Anaesthesist 24, 231, (1975)

Fujita, T., Suyama, T., Yokoyama, K.: Fluorcarbon emulsion as a candidate for artificial blood. Europ.Surg. Res. 3, 436, (1973)

Geyer, R.P., Monroe, R.G., Taylor, K.: Survival of rats having red cells totally replaced with emulsified fluorocabon. Fed.Proc. 27, 374, (1968)

Geyer, R.P.: Review of perfluorochemical-type blood substitute. Proc. Xth. Intern. Conc. Nutrition-Symposium on PFC Artificial Blood, Kyoto 1975 Oska, Med. Publ., 1975, p. 3

Green, H.D., Hall, L.S., Sexton, J., Deal D.P.: Autonimic vasomotor responces in the canine hepatic arterial and venous bed. Amer.J.Physiol 196, 196, (1959)

Grunst, J.: Über den Anoxie Zyklus der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber. Diss.med.Fak.Universität München. (1967)

Häussinger, D., Weiss, L., Sies, H.: Activation of pyruvate dehydrogenase during metabolism of ammonium ions in hemoglobin-free perfused rat liver. Eur.J.Biochem. 52, 421, (1975)

Häussinger, D., Sies, H.: Hepatic glutamine metabolism under the influence of the portal ammonia concentration in the perfused liver. Eur.J.Biochem. 101, 179, (1979)

Hanriot M., Richet, C.: Les chloraloses Arch.int.Pharmakodyn. 3, 191 (1897)

Hems, R., Ross, B.D., Berry, M.N., Krebs, H.A.: Gluconeogenesis in the perfused rat liver. Biochem.J. 101, 284, (1966)

Hornbrook, K.R., Burch, H.B., Lowry, O.H.: Biochem.biophys.Res.Commun. 18, 206, (1965) aus Hems (1966)

Jacobj, L.: Apparat zur Durchblutung isolierter überlebender Organe. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 26, 388, (1890)

Larsen, J.A., Krarup, N., Munch, A.: Liver hemodynamics and liver function in cats during graded hypoxic hyperemia. Acta Physiol. Scand. 98, 257, (1976)

Lundsgaard, E., Nielson, N.A., Orskov, S.L.: Carbohydrate metabolism of isolated cat liver. Skand. Archiv Physiol. 73, 296, (1936)

Lutz, J.: Untersuchungen über das hämodynamische Verhalten des mesenterialen Gefässsystems und dessen Reaktion auf Venendrucksteigerung. Habilitationsschrift Med.Fak. Würzburg, 1966

Lutz, J., Bauereisen, E.: Abdominalorgane, In: Schutz E. und Bauereisen E. (Ed.) Physiologie des Kreislaufs, S.229 Berlin-Heidelberg-New-York: Springer (1971)

Lutz, J., Henrich, H., Bauereisen, E.: Oxygen supply and uptake in the liver and the intestine. Pflügers Arch. 360, 7, (1975)

Lutz, J., Schulze, H.G.: Der Säure-Basenhaushalt in Darm- und Leberkrieslauf unter Ischämiebedingungen. Verh. dt. Ges. Kreisl. Forsch . 43, 435-436, (1977)

Lutz, J., Jacobs, A., Decke, B.,: Hepatic oxidative metabolism under hemoglobin-free perfusion with a new perfluorochemical emulsion. Pflügers. Arch. 373, R 26, (1978 a)

Lutz, J.,Decke, B., Bäuml, M., Schulze, H.-G.: High oxygen extraction combined with extensive oygen consumption in the rat liver perfused with Flusol-DA, a new perfluoro compound emulsion. Pflügers Arch. 376, 1, (1978 b)

Lutz, J., Metzenauer, P.: Effects of potential blood substitutes (perfluorochemimicals)on rat liver and spleen. Pflügers Arch. 387, 175-181,(1980)

Matsumoto, T., Watanabe, M., Yokoyama, K., Suyama, T., Naito, R.: Further studies on toxicity of Fluosol-DA. Proc.Sympos.Res. on PFC in Medicine and Biology, Huddinge , 1977 Stockholm, GOTAB 1978 p.42

Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L., Bale, W.F.: The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. J.exp.Med. 94, 431, (1951)

Molnar, J., György, L., Doda, M., Nador, K.: Comparative pharmacological studies of ganglionic stimulants. Arch.int. Pharmacodyn. 151, 22, (1964)

Müllhofer, G., Schwab, A., Müller, C., v.Stetten, C., Gruber, E.: Carbon 14 tracer studies in rat-liver perfusion experiments under conditions of gluconeogenesis from lactate and pyruvate. Eur.J.Biochm. 75, 319, (1977)

Naito, R., Yokoyama, K.: On the perfluorodecalin/phospholipid emulsion as the red cell substitue. Proc. Xth.Intern. Conc.Nutrition-Symposium on PFC Artificial Blood, Kyoto 1975, Osaka Med.Publ., 1975 p. 55

Naito, R., Yokoyama, K.: Perfluorochemical blood substitutes Fluosol 43, Fluosol-DA, 20% and 35% for prellinical studies as a canditate for erythrocyte substitution. In: Perfluorochemical blood substitutes, Ed: Naito R., Yokoyama K., Osaka, The Green Cross Corporation 1978 p.134

Novåkovå, V., Birke, G., Plantin, L.P, Wretlind, A.: A perfluorochemical oxygen carrier (Fluosol 43) in a synthetic medium used for perfusion of isolated rat liver. Acta physiol. scand. 98, 356, (1976)

Ohyanagi, H., Mitsuno, T.: Biophysical effects of perfluorochemicals as artificial blood. Proc. Xth.Int.Concr. Nutrition, Symposium on PFC Artificial Blood, Kyoto 1975, Osaka Med. Publ., 1975, p.21

Reering, E.: The release of ammonia from amino acids, studies with the perfused rat liver. Med.Diss. Universität Leiden, 1972

Ross, B.D., Hems, R., Krebs, H.A.: The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. Biochem.J. 102, 942, (1967)

Schimassek, H.: Perfusion of isolated rat liver with a semisynthetic medium and control of liver function. Life Sciences, 11, 629, (1962)

Schimassek, H.: Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber. Bio.Z. 336, 460, (1963)

Schmucker, D.L., Jones, A.L., Michielsen, E.: An improved system for hemoglobin-free perfusion of isolated rat livers. Lab.Invest. 33, 168, (1975)

Scholtholt, J.: Das Verhalten der Durchblutung der Leber bei Steigerung des Sauerstoffverbrauches der Leber. Pflügers Arch. 318, 202, (1970)

Scholz, R., Bücher, Th.: Hemoglobin-free perfusion of rat liver In: Control of energy metabolism. Ed.: Chance B., New York, Academic Press, 1965, p. 393

Scholz, R., Zehner, J., Bücher, Th.: Gluconeogenese in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber, Acta hepato-splenol. 13, 376, (1966)

Scholz, R.: Hämoglobinfreie Durchströmung der isolierten Rattenleber und Untersuchungen zur Redoxkomportimentierung. Habilitationsschrift Med.Fak. München (1967)

Scholz, R., Hansen, W., Thurman, R.G.: Interaction of mixed function oxidation with biosynthetic processes. 1.Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrin in perfused rat liver. Eur.J.Biochem. 38, 64, (1973)

Simpson, R.C., Hill, F.W., Freedland, R.A.: Gluconeogenesis from L-Cystein in the perfused rat liver. J.Nutr. 105, 379, (1975)

Sloviter, H,A., Kamimoto, T.: Erythrocyte substitute for perfusion of brain. Nature 216, 458, (1967)

Thurman, R.G., Scholz, R.: Mixed function oxidation in perfused rat liver, the effect of aminopyrine on oxygen uptake. Eur.J.Biochem. 10, 459, (1969)

Thurman, R.G., Scholz, R.: Interaction of glycolysis and respiration in perfused rat liver. Eur.J.Biochem. 75, 13, (1977)

Topping, D.L., Clark, D.G., Storer, G.B., Trimble, R.P., Illman, R.J.: Acute effects of ethanol on the perfused rat liver. Biochem.J. 184, 97, (1979)

Torrance, H.B.: Control of the hepatic arterial circulation. J.Physiol. 158, 39, (1961)

Triner, L., Verosky, M., Habit, D.V., Nahas, D.G.: Perfusion of isolated liver with fluorocarbon emulsion. Fed.Proc. 29, 1778, (1970)

Trowell, A.O.: Urea Formation in the isolated perfused liver of the rat. J.Physiol. 100, 432, (1942)

Valery, D.R., Zaroulis, G.C., Mardrioni, L., Patti, K.J.: A simple method for measuring oxygen content in blood. J.Lab.Clin.Med. 79, 1035 (1972)

Yokoyama, K., Yamanouchi, K., Arimura, H., Naito, R.: Further studies on the fate of PFC's of Fluosol-DA following intravenous injection. Proc.Sympos.Res. on PFC in Medicine and Biology, Huddinge 1977, Stockholm GOTAB 1978 p. 311

Yokoyama, K., Yamanouchi, K., Ohyanagi, H., Mitsuno, T.: Fate of perfluorchemicals in animals after intravenous injection or hemodilution with their emulsions. Chem.Pharm.Bull. (Tokyo) 26, 956, (1978)

Yuki, T., Thurman R.: The swift increase of alcohol metabolism. Time course for the increase in hepatic oxygen uptake and the involvement of glycolysis. Biochem.J.186,119,(1980)

Lebenslauf

Am 22. April 1954 wurde ich als erster Sohn des Vermessungsingenieurs Reinhard Decke und seiner Ehefrau Marga Decke, geb. Rixner in Wallmersbach geboren. Seit 1979 bin ich mit Sabine Jesser verheiratet.

Nach dem Besuch der Volksschule von 1960 bis 1964 in Würzburg, wechselte ich 1964 auf das Röntgen-Gymnasium in Würzburg und legte dort im Juni 1973 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1973/74 begann ich das Studium der Medizin in Würzburg. Dort bestand ich im August 1975 die Ärztliche Vorprüfung, im August 1976 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, im August 1978 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Im "Praktischen Jahr" war ich je vier Monate in der Medizinischen-, Chirurgischen- und Urologischen Universitätsklinik Würzburg eingesetzt.
Im November 1979 bestand ich in Würzburg den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.

Von Februar 1980 bis Ende April 1981 war ich als wehrpflichtiger Stabsarzt bei der Bundeswehr tätig.

Seit Juni 1981 arbeite ich in der Klinischen Abteilung des Diabetes Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf.

Bernhard Decke